

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LARISSA PICKLER

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA NO TRATO
GASTRINTESTINAL DE FRANGOS DESAFIADOS COM
Salmonella enterica: USO DE ADITIVOS FITOGÊNICOS E
ÁCIDOS ORGÂNICOS

CURITIBA
2016

LARISSA PICKLER

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA NO TRATO
GASTRINTESTINAL DE FRANGOS DESAFIADOS COM
Salmonella enterica: USO DE ADITIVOS FITOGÊNICOS E
ÁCIDOS ORGÂNICOS

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutor em Ciências
Veterinárias, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias, Área de Concentração:
Patologia Veterinária, Setor de Ciências
Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Orientação: Prof.^a Dr.^a Elizabeth Santin

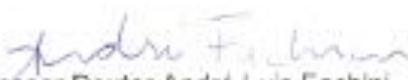
CURITIBA
2016

PARECER DA BANCA**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS****PARECER**

A Comissão Examinadora da Defesa da Tese intitulada “**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA NO TRATO GASTROINTESTINAL DE FRANGOS DESAFIADOS COM *Salmonella enterica*: USO DE ADITIVOS FITOGÊNICOS E ÁCIDOS ORGÂNICOS**” apresentada pela Doutoranda **LARISSA PICKLER** declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09–CEPE/UFPR, que considerou a candidata aprovada para receber o Título de Doutor em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 29 de fevereiro de 2016


Professora Doutora Elizabeth Santin
Presidente


Professor Doutor André Luis Fachini
Membro


Doutora Mariana Lemos de Moraes
Membro


Doutor Ivomar Oldoni
Membro


Doutor Eduardo Correa Muniz
Membro

AGRADECIMENTOS

À Deus por guiar meus passos e me encorajar nos momentos difíceis.

Aos meus familiares e meu namorado pelo apoio incondicional.

Aos meus orientadores Dra. Elizabeth Santin da UFPR pelo aprendizado e incentivo, Dr. John Maurer e Dra. Margie Lee da Universidade da Georgia por terem me recebido de braços abertos no PDRC e ao Dr. Timothy Hoover e a Dra. Monique França pela valiosa colaboração nos experimentos.

À todos os professores da Universidade Federal do Paraná e do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias por todos os ensinamentos durante esses anos, em especial à Dra. Carla Molento, Dr. Fabiano Montianni-Ferreira, Dr. Alex Maiorka e Dr. Alexander Biondo.

Aos colegas do Poultry Diagnostic and Research Center Kasey, Nimi, Karen, Gustavo, Gabriela, Rafael, Christina, Ana Maria, Lisa, Jennifer, Christian, Raja e Camir pela amizade e convívio durante o período de doutorado sanduíche.

Aos colegas do Instituto Federal Catarinense, campus Araquari Suzana Mota, Deolinda Carneiro, Marlise Pompeu Claus, Viviane Milczewski, Bethânia Medeiros, André Fachini, Juahil de Oliveira, Danielle Westphalen, Cléder Somensi, Matheus Folgareini Silveira, Simone Pereira, Robilson Weber, Érica Bako e Ana Cláudia Ferreira pelo grande exemplo de profissionalismo.

Aos queridos alunos do IFC-Araquari com os quais tive a oportunidade de compartilhar meus conhecimentos.

Aos estagiários do LABMOR que sem medir esforços auxiliaram na realização dos experimentos.

Aos colegas da BRF do Laboratório de Saúde Animal de Videira pelos conhecimentos compartilhados nos últimos meses.

À Fundação CAPES e ao programa Ciência Sem Fronteiras pela oportunidade única de realizar doutorado sanduíche no exterior.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	viii
Lista de Figuras.....	x
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiii
1 Introdução.....	14
1.1 Referências.....	16
2 <i>Salmonella</i> em frangos: fatores de virulência, dinâmica celular no trato gastrintestinal e medidas de controle.....	20
2.1 Resumo.....	20
2.2 Abstract.....	20
2.3 Introdução.....	21
2.4 Gênero <i>Salmonella</i> e epidemiologia.....	21
2.5 Doença em aves.....	23
2.6 Fatores de virulência.....	24
2.6.1 Adesão.....	24
2.6.2 Invasão.....	25
2.6.3 Sobrevivência na célula hospedeira.....	26
2.7 Dinâmica celular do trato gastrintestinal de frangos.....	27
2.8 Controle da <i>Salmonella</i> em frangos.....	30
2.9 Considerações Finais.....	32
2.10 Referências.....	33
3 Efeito da sanguinarina na água de bebida no controle da <i>Salmonella</i> e expressão de células imunológicas no sangue periférico e mucosa intestinal de frangos.....	46
3.1 Resumo.....	47
3.2 Abstract.....	47
3.3 Introdução.....	48
3.4 Material e Métodos.....	49
3.5 Resultados e Discussão.....	51
3.6 Conclusões.....	57
4 Resposta imunológica e uso de ácidos orgânicos em frangos desafiados com <i>Salmonella</i> Minnesota.....	63

4.1 Resumo.....	64
4.2 Abstract.....	65
4.3 Introdução.....	67
4.4 Material e Métodos.....	67
4.5 Resultados.....	72
4.6 Discussão.....	75
4.7 Conclusões.....	78
4.8 Referências.....	78
5 Análise retrospectiva de resultados de microbiologia e dinâmica celular imunológica de aves desafiadas com <i>Salmonella enterica</i> sorovares Enteritidis, Minnesota e Heidelberg.....	82
5.1 Resumo.....	83
5.2 Abstract.....	83
5.3 Introdução.....	85
5.4 Material e Métodos.....	85
5.5 Resultados e Discussão.....	88
5.6 Conclusões.....	101
5.8 Referências.....	102
6 Avaliação da contribuição de genes de função desconhecida na colonização da <i>Salmonella</i> no trato gastrintestinal de frangos.....	106
6.1 Resumo.....	107
6.2 Abstract.....	107
6.3 Introdução.....	109
6.4 Material e Métodos.....	110
6.5 Resultados.....	112
6.6 Discussão.....	114
6.7 Conclusões.....	116
6.8 Referências.....	116
7 Considerações finais.....	119
8 Anexos.....	121
8.1 Anexo 1.....	121
8.2 Anexo 2.....	122

LISTA DE TABELAS

Capítulo 3 - Efeito da sanguinarina na água de bebida no controle da *Salmonella* e expressão de células imunológicas no sangue periférico e mucosa intestinal de frangos

Tabela 1. Contagem de <i>Salmonella</i> Enteritidis (SE) em swabs de cloaca 48 hpi (horas pós inoculação) e número de amostras positivas e negativas no papo e ceco aos 7 dpi (dias pós inoculação).....	52
Tabela 2. Parâmetros histológicos e imunológicos no duodeno, jejuno, íleo e ceco de aves aos 21 dias de idade recebendo ou não sanguinarina na água de bebida (n=20/tratamento).....	53
Tabela 3. Porcentagens de subpopulações celulares identificadas no sangue periférico. (n=4/tratamento).....	55

Capítulo 4 - Resposta imunológica e uso de ácidos orgânicos em frangos desafiados com *Salmonella* Minnesota

Tabela 1. Descrição dos tratamentos do experimento 1.....	68
Tabela 2. Descrição dos tratamentos do experimento 3.....	71
Tabela 3. Resultados em número de aves positivas para <i>Salmonella</i> em relação ao total de aves analisadas nos diferentes órgãos de animais 12, 24 e 48 h após inoculação.....	72
Tabela 4. Resultados da concentração inibitória mínima (CIM) dos diferentes ácidos orgânicos e dose utilizada no experimento <i>in vivo</i>	74
Tabela 5. Média e desvio padrão da contagem de <i>Salmonella</i> em suabes de cloaca 48 h após inoculação, papo e ceco 7 dias após inoculação nos diferentes tratamentos (Resultados expressos em Log 10).....	75

Capítulo 5 – Análise retrospectiva de resultados de microbiologia e dinâmica celular imunológica de aves desafiadas com *Salmonella enterica* sorovares Enteritidis, Minnesota e Heidelberg.

Tabela 1. Descrição do sorovar de <i>Salmonella</i> , data de desafio e dose do desafio utilizadas na análise retrospectiva.....	87
Tabela 2. Contagem de <i>Salmonella</i> Enteritidis, Minnesota e Heidelberg aos 2, 4, 7, 14, 21 e 28 dias pós-desafio no ceco de aves desafiadas (Resultados transformados em Log10 UFC/g).....	89

Tabela 3. Comparação da data de desafio na contagem de <i>Salmonella</i> Enteritidis, Minnesota e Heidelberg no ceco aos 21 dias pós-desafio (dpd). (Resultados transformados em Log10 UFC/g).....	90
Tabela 4. Comparação da dose de desafio na contagem de <i>Salmonella</i> Enteritidis, Minnesota e Heidelberg em diferentes dias pós-desafio (dpd) (Resultados transformados em Log10 UFC/g)	91
Tabela 5. Alteração histológica no íleo de aves não desafiadas e desafiadas com <i>Salmonella</i> Enteritidis, Minnesota e Heidelberg ao 1º, 2º, 4º, 18º, 21º e 28º dia pós-desafio (dpd)	93
Tabela 6. Escore de alteração no ceco de aves não desafiadas e desafiadas com <i>Salmonella</i> Enteritidis e Minnesota ao 1º, 2º, 21º e 28º dia pós-desafio (dpd)	94
Tabela 7. Contagem de células caliciformes por campo de aves não desafiadas ou desafiadas com <i>Salmonella</i> Enteritidis, Minnesota e Heidelberg ao 1º, 2º, 4º, 18º, 21º e 28º dia pós-desafio	95
Tabela 8. Contagem de células caliciformes por campo no ceco de aves não desafiadas ou desafiadas com <i>Salmonella</i> Enteritidis e Minnesota ao 1º, 2º, 21º e 28º dia pós-desafio (dpd).....	96
Tabela 9. Contagem de células CD4+ no íleo de aves não desafiadas e desafiadas com <i>Salmonella</i> Enteritidis, Minnesota e Heidelberg ao 1º, 2º, 4º, 14º, 18º e 28º dia pós-desafio (dpd).....	96
Tabela 10. Contagem de células CD4+ no ceco de aves não desafiadas e desafiadas com <i>Salmonella</i> Enteritidis, Minnesota e Heidelberg ao 1º, 2º, 4º, 14º, 18º e 28º dia pós-desafio (dpd).....	97
Tabela 11. Contagem de células CD8+ no íleo de aves não desafiadas e desafiadas com <i>Salmonella</i> Enteritidis, Minnesota e Heidelberg ao 1º, 2º, 4º, 14º, 18º e 28º dia pós-desafio (dpd)	98
Tabela 12. Contagem de células CD8+ no ceco de aves não desafiadas e desafiadas com <i>Salmonella</i> Enteritidis, Minnesota e Heidelberg ao 1º, 2º, 4º, 14º, 18º e 28º dia pós-desafio (dpd)	99
Tabela 13. Comparação entre datas de desafio na quantidade de células CD4+ e CD8+ no íleo e ceco de aves aos 28 dias pós-desafio (dpd) com <i>Salmonella</i> Enteritidis	100
Tabela 14. Comparação entre dose desafio na contagem de células CD4+ e CD8+ no íleo e ceco de aves aos 28 dias pós-desafio (dpd) com <i>Salmonella</i> Enteritidis	101

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 3 - Efeito da sanguinarina na água de bebida no controle da *Salmonella* e expressão de células imunológicas no sangue periférico e mucosa intestinal de frangos

Figura 1. Expressão de células CD3+ (imunoistoquímica) no jejuno aos 21 dias de idade de aves desafiadas com *Salmonella* Enteritidis não tratadas (A) ou tratadas com sanguinarina (B). Setas indicam células CD3+.....54

Figura 2. - Expressão de células caliciformes (Alcian Blue) no jejuno aos 21 dias de idade de aves desafiadas com *Salmonella* Enteritidis e não tratadas (A) ou tratadas com sanguinarina (B). Setas indicam células caliciformes.....54

Capítulo 4 - Resposta imunológica e uso de ácidos orgânicos em frangos desafiados com *Salmonella* Minnesota

Figura 1. Contagem (média e desvio padrão) de células caliciformes, células CD3+ e relação caliciformes:CD3+ no jejuno às 12, 24 e 48 h após inoculação. VO – inoculados via oral; VR – inoculados via ração; CN – controle negativo; CT – aves contato.....73

Figura 2. Contagem (média e desvio padrão) de células caliciformes, células CD3+ e relação caliciformes:CD3+ no íleo às 12, 24 e 48 h após inoculação. VO – inoculados via oral; VR – inoculados via ração; CN – controle negativo; CT – aves contato.....73

Figura 3. Contagem (média e desvio padrão) de células caliciformes, células CD3+ e relação caliciformes:CD3+ no ceco às 12, 24 e 48 h após inoculação. VO – inoculados via oral; VR – inoculados via ração; CN – controle negativo; CT – aves contato.....74

Capítulo 5 - Análise retrospectiva de resultados de microbiologia e dinâmica celular imunológica de aves desafiadas com *Salmonella enterica* sorovares Enteritidis, Minnesota e Heidelberg.

Figura 1. A – Vilosidade sem alterações (aves não desafiadas). B – vilosidades com alterações: proliferação de células caliciformes, proliferação de enterócitos, congestão vascular (aves desafiadas); C – vilosidades com alterações: severa infiltração de células inflamatórias na lâmina própria, proliferação de células caliciformes e enterócitos (aves desafiadas); D – vilosidade com alterações: severa infiltração de células inflamatórias na lâmina própria e epitélio (aves desafiadas). Aves – íleo – HE/Alcian Blue – Magnificação de 100x.92

Capítulo 6 – Avaliação da contribuição de genes de função desconhecida na colonização da *Salmonella* no trato gastrointestinal de frangos.

Figura 1. Detecção da <i>Salmonella</i> Typhimurium bioluminescente aos 3, 7 e 14 dias de idade no baço, fígado, ceco e papo de frangos desafiados	112
Figura 2. Contribuição de genes da <i>Salmonella</i> Typhimurium de função desconhecida na colonização do TGI de aves. Índices Competitivos para mutantes de <i>Salmonella</i> Typhimurium: (A) $\Delta ydiP$; (B) $\Delta mltA$; (C) $\Delta stm3780$; (D) $\Delta stm3601$; e (E) $\Delta gfrEF$	113
Figura 3. Contagem de <i>Salmonella</i> (Log10 UFC/g) em aves desafiadas com <i>Salmonella</i> Typhimurium cepas mutantes e parenterais (WT).....	114

RESUMO

Salmonella é uma bactéria responsável por perdas econômicas na cadeia avícola e por toxinfecções alimentares em pessoas. A bactéria pode ser sistêmica como *Salmonella* Pullorum e *Salmonella* Gallinarum, causando septicemia e mortalidade ou não sistêmica, como *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Minnesota que desenvolvem poucos sinais clínicos nos animais. A presente Tese está dividida em 6 capítulos. O capítulo 1 refere-se à Introdução, abordando aspectos básicos da epidemiologia da *Salmonella* e o objetivo geral do trabalho. No capítulo 2 é apresentada uma revisão sobre a patogenicidade da *Salmonella*, abordando seus principais fatores de virulência na célula hospedeira. Além disso, também são abordadas as principais alterações na dinâmica celular do trato gastrointestinal ocasionada pela *Salmonella* e as principais medidas de controle da enfermidade em plantéis avícolas. Essas medidas de controle vão desde medidas básicas de biossegurança até aditivos como ácidos orgânicos, aditivos fitogênicos e produtos que proporcionam exclusão competitiva. No capítulo 3 foi demonstrado que o extrato de sanguinarina na água de bebida é eficiente em reduzir a contagem de *Salmonella* Enteritidis no papo e ceco de frangos, além de reduzir a expressão de células caliciformes e CD3+ no duodeno e jejuno e aumentar a expressão de células imunológicas no sangue periférico quando comparados ao grupo que não recebeu sanguinarina. No capítulo 4 foi avaliada a patogenia da *Salmonella* Minnesota em frangos de corte e avaliou-se o efeito *in vitro* e *in vivo* de diferentes ácidos orgânicos demonstrando a baixa eficiência destes no controle da *Salmonella* Minnesota. No capítulo 5 foi realizada a análise retrospectiva de resultados de microbiologia e dinâmica da imunidade celular do trato gastrointestinal de frangos desafiados com *Salmonella enterica* sorovares Enteritidis, Minnesota e Heidelberg, onde se observou que a quantidade de salmonela no ceco e a mobilização de células imunológicas no trato gastrointestinal de frangos desafiados é dependente do sorovar avaliado. No capítulo 6, em trabalho realizado em parceria com a Universidade da Geórgia, foi avaliada a contribuição de genes da *Salmonella* Typhimurium de função desconhecida na colonização do trato gastrointestinal de frangos. Estes estudos demonstram a interferência dos diferentes sorovares de salmonelas paratíficas na dinâmica celular do trato gastrointestinal de aves e algumas medidas de controle desta enfermidade.

Palavras-chave: *Salmonella enterica*, imunoistoquímica, células caliciformes, sistema imunológico, linfócitos T, aditivos.

ABSTRACT

Salmonella is a bacterium responsible for economic losses in the poultry chain and food poisoning in humans. This bacterium can be systemic in birds such as *Salmonella* Pullorum and *Salmonella* Gallinarum causing septicemia and mortality or non-sistemic such as *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Minnesota that present few clinical signs in animals. This Thesis is divided into six chapters. Chapter 1 refers to Introduction, addressing basic aspects of *Salmonella* epidemiology and the overall objective of the thesis. Chapter 2 presents a review of *Salmonella* pathogenicity, addressing its major virulence factors into the host cell. It is also addressed the major changes in cellular dynamics of the gastrointestinal tract caused by *Salmonella* and the main forms of disease control in poultry flocks. These forms of control range from basic biosecurity measures to additives such as organic acids, phytogetic additives and products that provide competitive exclusion. Chapter 3 shows that sanguinarine extract in drinking water is effective in reducing *Salmonella* Enteritidis count in crop and cecum of chickens, while reducing the expression of goblet cells and CD3+ cells in duodenum and jejunum and increasing immune cell expression in the peripheral blood when compared to the group that did not receive sanguinarine. Chapter 4 presents the evaluation of *Salmonella* Minnesota pathogenesis in broilers where the effect *in vitro* and *in vivo* of different organic acids was evaluated showing their low efficiency of *Salmonella* Minnesota control. Chapter 5 demonstrates a retrospective analysis of results of microbiology and immune cellular dynamics of gastrointestinal tract of challenged chickens with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, Minnesota and Heidelberg, where it was observed that the number of *Salmonella* in the cecum and the mobilization of immunological cells in gastrointestinal tract of challenged chickens is dependent on the assessed serovar. Chapter 6 presents the study performed in partnership with the University of Georgia where it was evaluated *Salmonella* Typhimurium gene contribution of unknown function in colonizing the gastrointestinal tract of chickens. These studies demonstrate the interference of different paratyphoid *Salmonella* serovars in cellular dynamics of poultry gastrointestinal tract and some control measurements of this disease.

Key-words: *Salmonella enterica*, immunohistochemistry, goblet cells, immune system, T lymphocytes, additives.

1 INTRODUÇÃO

A Salmonelose, ocasionada por bactérias do gênero *Salmonella*, é uma das zoonoses mais importantes no Brasil e no mundo devido sua elevada endemicidade, alta morbidade, diversas fontes de contaminação e, sobretudo pelo difícil controle e eliminação.

A *Salmonella* tem a habilidade de se multiplicar no trato gastrointestinal de aves e contaminar o ambiente devido excreção das bactérias pelas fezes. A *Salmonella* também invade a mucosa intestinal, as tonsilas cecais, placas de Peyer, onde ocasiona significativas alterações na dinâmica celular. Apresenta também a capacidade de sobreviver e multiplicar em macrófagos disseminando-se pelo fígado e baço, chegando a corrente sanguínea e infectando assim outros órgãos como os do trato reprodutivo e respiratório (Chappell *et al.*, 2009).

O gênero *Salmonella* é dividido em duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori*. A espécie *Salmonella enterica* por sua vez é dividida em 6 subespécies bioquimicamente distintas (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*) que são ainda diferenciadas em centenas de sorovares identificados por nomes ou números, totalizando cerca de 2.500 sorovares e a predominância deles varia conforme espécie, região e época do ano (Brenner *et al.*, 2000). Shelobolina *et al.* (2004) identificaram ainda uma nova espécie, a *Salmonella subterranea*, porém posteriormente verificou-se que ela é muito semelhante a *Escherichia hermanii* não pertencendo ao gênero *Salmonella*.

Ao longo do tempo observou-se alternância na prevalência dos sorovares em aves. No Brasil, no período entre 1960 até 1990, *Salmonella Gallinarum* e *Salmonella Pullorum* eram muito frequentes na produção avícola ocasionando grandes perdas produtivas devido altas taxas de morbidade e mortalidade resultado da manifestação dos sinais clínicos como septicemia e diarreia (Hofer *et al.*, 1997). Em 1994, o Ministério da Agricultura implantou o Programa Nacional de Sanidade Avícola por meio da Portaria 193 de 1994 com o objetivo de monitorar, diagnosticar precocemente e reduzir a mortalidade de frangos por pulorose e tifo aviário, reduzindo a incidência dessas salmonelas na produção avícola (Brasil, 1994).

Uma das consequências da erradicação da *S. Gallinarum* em frangos foi a emergência da *S. Enteritidis*, que diferentemente do sorovar anterior, não ocasionava mortalidade, porém apresentava alta morbidade e as aves acometidas apresentavam pouco ou nenhum sinal clínico. Isso refletiu diretamente na saúde pública, pois diferentemente da *S. Gallinarum*, a *S. Enteritidis* é um agente causador de toxinfecção alimentar em pessoas. Entre os anos 1970 e 1990 o percentual de isolamentos de *S. Enteritidis* passou de 0,37% para 60,4% entre 1991 e

1996 em amostras de seres humanos (Peresi *et al.*, 1998). Este mesmo aumento na prevalência de *S. Enteritidis* também foi observada nas amostras de origem animal onde este número passou de 0,85% entre 1970 e 1990 para 40,7% entre 1991 e 1996. Acredita-se que os sorovares Gallinarum e Enteritidis competem pelos mesmos sítios de ação, devido à expressão do lipopolissacarídeo O9 na superfície celular, dessa forma a erradicação de uma pode ter favorecido a emergência da outra (Rabsch *et al.*, 2000).

Diferentes sorotipos de salmonelas paratíficas têm sido isolados de amostras de aves. Estudos de Cortez *et al.*, 2006 identificaram maior predominância de *S. Kentucky* e *S. Enteritidis* em abatedouros de aves. Boni *et al.*, 2011 verificaram a predominância dos sorotipos Typhimurium e Enteritidis em amostras coletadas de aviários e abatedouros de frangos de corte na região central do Mato Grosso do Sul. Mais recentemente, em amostras de suabe de arrasto provenientes de granjas do Paraná, os sorotipos mais frequentemente isolados foram Heidelberg, Mbandaka, Newport, Schwarzengrund, Enteritidis, Livingstone, Orion, Give e Infantis (Pandini *et al.*, 2015). Ainda, Voss-Rech *et al.*, 2015 identificaram 50 sorotipos de *Salmonella* em amostras frangos de corte de todo Brasil, sendo a *Salmonella* Minnesota o sorovar mais frequentemente isolado com 40,24% das amostras, seguido pelo sorovar Infantis com 14,63%, Heidelberg com 7,31%, Senftenberg com 6,09% e Mbandaka com 6,09% do total de amostras analisadas.

O controle da *Salmonella* paratífica em frangos de corte visa basicamente impedir a entrada deste microrganismo na cadeia alimentar, evitando surtos de gastroenterite em seres humanos. Para isso a indústria deve utilizar além de um bom programa de biossegurança, aditivos adicionados à ração e água como ácidos orgânicos, aditivos fitogênicos, probióticos e prebióticos. Ácidos orgânicos já se mostraram eficientes no controle de salmonelose em aves (Bassan *et al.*, 2008; Flores *et al.*, 2012; Pickler *et al.*, 2012), bem como aditivos fitogênicos (Bajpai *et al.*, 2012; Bona *et al.*, 2012; Pickler *et al.*, 2013), probióticos (Knap *et al.*, 2011; Kuritza *et al.*, 2013) e prebióticos (Santos *et al.*, 2013).

O genoma da *Salmonella* já foi sequenciado e anotado, porém existem ainda genes com função biológica desconhecida. A *Salmonella* abriga genes de virulência, que foram adquiridos por meio de transferência genética horizontal e encontram-se reunidos nas ilhas de patogenicidade que codificam genes envolvidos na adesão de células do hospedeiro, invasão, sobrevivência dentro da célula e mecanismos de defesa do sistema imunológico (revisado por Fortes *et al.*, 2012). Além disso, acredita-se que os genes pertencentes aos plasmídeos de virulência, operons de fímbrias, fagos lisogênicos e ilhas de patogenicidade são importantes para conferir especificidade ao hospedeiro.

Dessa forma, o objetivo desta tese foi entender a relação de alguns sorovares de salmonelas paratíficas com a resposta imunológica do trato gastrointestinal de aves, avaliar os aditivos fitogênicos e ácidos orgânicos no controle dessa bactéria e investigar a contribuição de genes de função desconhecida na sobrevivência da *Salmonella* no trato gastrointestinal de aves.

1.1 REFERÊNCIAS

Bajpai, V.K.; Baek, K.-H. Kang, S.C. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 722-734, 2012.

Bassan, J.D.L.; Flôres, M.L.; Antoniazzi, T.; Bianchi, E.; Kuttel, J.; Trindade, M.M. Controle da infecção por *Salmonella* Enteritidis em frangos de corte com ácidos orgânicos e mananoligossacarídeo. **Ciência Rural**, v. 38, p. 1961-1965, 2008.

Bona, T.D.M.M.; Pickler, L.; Miglino, L.B.; Kuritza, L.N.; Vasconcelos, S.P.; Santin, E. Óleo essencial de orégano, alecrim, canela e extrato de pimenta no controle de *Salmonella*, *Eimeria* e *Clostridium* em frangos de corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 411-418, 2012.

Boni, H.; Carrijo, A.; Fascina, V. Ocorrência de "*Salmonella*" spp. em aviários e abatedouro de frangos de corte na região central de Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.12, n. 1, p. 84-95, 2011.

Brasil. Portaria 193, de 9 de setembro de 1994. Institui o Programa Nacional de Sanidade Avícola e cria o Comitê consultivo do programa. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**, 1994.

Brenner, F.W.; Villar, R.G.; Angulo, F.J.; Tauxe, R.; Swaminathan, B. *Salmonella* Nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 7, p. 2465-2467, 2000.

Chappell, L.; Kaiser, P.; Barrow, P.; Jones, M.A.; Johnston, C. Wigley, P. The immunobiology of avian systemic salmonellosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1-3, p. 53-59, 2009.

Cortez, A.L.L.; Carvalho, A.C. F.B.; Ikuno, A.A.; Bürger, K.P.; Vidal-Martins, A.M.C. Resistência antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp. isoladas de abatedouros de aves. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.73, n.2, p.157-163, 2006.

Flores, F.; Lovato, M.; Wilsmann, C.G.; Gazoni, F.L.; Silveira, F.; Caron, L.F.; Beirão, B.C.B. Comportamento de células do sistema imune frente ao desafio com *Salmonella* Enteritidis em aves tratadas e não tratadas com ácidos orgânicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 495-502, 2012.

Fortes, T.P.; Fagundes, M.Q.; Vasconcellos, F.A.; Timm, C.D. Silva, É.F.D. Ilhas de patogenicidade de *Salmonella enterica*: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 71, n. p. 219-227, 2012.

Hofer, E.; Silva Filho, S.J.D.; Reis, E.M.F.D. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17, p. 55-62, 1997.

Knap, I.; Kehlet, A.B.; Bennedsen, M.; Mathis, G.F.; Hofacre, C.L.; Lumpkins, B.S.; Jensen, M.M.; Raun, M.; Lay, A. *Bacillus subtilis* (DSM17299) significantly reduces *Salmonella* in broilers. **Poultry Science**, v. 90, n. 8, p. 1690-1694, 2011.

Kuritz, L.N.; Lourenço, M.C.; Miglino, L.B.; Pickler, L.; Kraieski, L.A.; Santin, E. Effects of *Enterococcus faecium* on diet in the dynamics of CD4+ and CD8+ cell infiltration in the intestinal mucosa of broilers challenged with *Salmonella* Minnesota. **International Journal of Poultry Science**, v. 12, n. 9, p. 523-528, 2013.

Pandini, J.A.; Pinto, F.G.D.S.; Muller, J.M.; Weber, L.D.; Moura, A.C.D. Ocorrência e perfil de resistência antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de aviários do Paraná, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, p. 1-6, 2015.

Peresi, J.T.M.; Almeida, I.A.Z.C.; Lima, S.I.; Marques, D.F.; Rodrigues, E.C.A.; Fernandes, S.A.; Gelli, D.S.; Irino, K. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis. **Revista de Saúde Pública**, v. 32, p. 477-483, 1998.

Pickler, L.; Beirão, B.C.B.; Hayashi, R.M.; Durau, J.F.; Lourenço, M.C.; Caron, L.F.; Santin, E. Effect of sanguinarine in drinking water on *Salmonella* control and the expression of immune cells in peripheral blood and intestinal mucosa of broilers. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 22, n. 3, p. 430-438, 2013.

Pickler, L.; Hayashi, R.M.; Lourenço, M.C.; Miglino, L.B.; Caron, L.F.; Beirão, B.C.B.; Silva, A.V.F.; Santin, E. Avaliação microbiológica, histológica e imunológica de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis e Minnesota e tratados com ácidos orgânicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 27-36, 2012.

Rabsch, W.; Hargis, B.M.; Tsolis, R.M.; Kingsley, R.A.; Hinz, K.H.; Tschape, H.; Bauml, A.J. Competitive exclusion of *Salmonella* Enteritidis by *Salmonella* Gallinarum in poultry. **Emerging Infectious Disease**, v. 6, n. 5, p. 443-448, 2000.

Santos, E.G.; Costa, F.G.P.; Silva, J.H.V.; Martins, T.D.D.; Figueiredo-Lima, D.F.; Macari, M.; Oliveira, C.J.B.; Givisiez, P.E.N. Protective effect of mannan oligosaccharides against early colonization by *Salmonella* Enteritidis in chicks is improved by higher dietary threonine levels. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n. 4, p. 1158-1165, 2013.

Shelobolina, E.S.; Sullivan, S.A.; O'Neill, K.R.; Nevin, K.P. Lovley, D.R. Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from Low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella* subterranea sp. nov. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 5, p. 2959-2965, 2004.

Voss-Rech, D.; Vaz, C.S.L.; Alves, L.; Coldebella, A.; Leão, J.A.; Rodrigues, D.P.; Back, A. A temporal study of *Salmonella* enterica serotypes from broiler farms in Brazil. **Poultry Science**, v.94, n. 3, p. 433-441, 2015.

**CAPÍTULO 2 - *SALMONELLA* EM FRANGOS: FATORES DE VIRULÊNCIA,
DINÂMICA CELULAR DO TRATO GASTRINTESTINAL E MEDIDAS DE
CONTROLE**

2 *SALMONELLA* EM FRANGOS: FATORES DE VIRULÊNCIA, DINÂMICA CELULAR DO TRATO GASTRINTESTINAL E MEDIDAS DE CONTROLE

Salmonella in chickens: virulence factors, cellular dynamics in gut and control measures

2.1 RESUMO

Salmonella é uma bactéria responsável por perdas econômicas e por toxinfecções alimentares em pessoas. A bactéria pode ser específica de aves como *Salmonella* Pullorum e *Salmonella* Gallinarum, causando septicemia e mortalidade ou inespecífica, cursando com poucos sinais clínicos, como *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis. A bactéria apresenta complexa patogenicidade, com diversos fatores de virulência responsáveis pela adesão, invasão, formação de vacúolo, sobrevivência, replicação e captação de nutrientes na célula hospedeira. Além disso, a presença da *Salmonella* causa alterações significativas na dinâmica das células presentes na mucosa intestinal. A complexidade desses fatores torna difícil o controle da *Salmonella* e há uma constante busca por alternativas, como ácidos orgânicos, aditivos fitogênicos, prebióticos, probióticos e vacinas que contribuem para o equilíbrio da microbiota intestinal e consequente controle de doenças em frangos de corte. A presente revisão tem como objetivos abordar particularidades, epidemiologia, patogenicidade, alterações na mucosa intestinal e formas de controle da *Salmonella enterica* em frangos.

Palavras-chave: fatores de patogenicidade, interação bactéria-hospedeiro, *Salmonella enterica*, mucosa intestinal, biossegurança, aditivos alimentares.

2.2 ABSTRACT

Salmonella is a bacteria responsible for economic losses and food poisoning in humans. This bacteria could be poultry specific as *Salmonella* Pullorum and *Salmonella* Gallinarum, causing septicemia and mortality, or unspecific, causing a few clinical signs, as *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis. Bacteria presents complex pathogenicity and virulence factors responsible for adhesion, invasion, vacuole formation, survive, replication and nutrient capitation on the host cell. Besides, the presence of *Salmonella* causes significant alterations on cellular dynamics in intestinal mucosa. The control of *Salmonella* is difficult because of the complexity of these virulence factors and there are a constant demand for alternatives as organic acids, phytogetic additives, prebiotics, probiotics and vaccines that may contribute to gut microbiota balance and to disease control in broiler chickens. The aim of this paper is to review the *Salmonella enterica* particularities, epidemiology, pathogenicity, intestinal mucosa alterations and its control in broiler chickens.

Key-words: pathogenicity factors, host-bacteria interaction, *Salmonella enterica*, gut mucosa biosecurity, feed additives.

2.3 INTRODUÇÃO

Salmonella spp. é um bastonete, Gram-negativo da família *Enterobacteriaceae*, anaeróbio facultativo e comporta-se como patógeno intracelular facultativo. (Kreig e Holt, 1984).

A doença em aves pode cursar com septicemia, diarreia, alta mortalidade quando ocasionada pelos sorovares Gallinarum e Pullorum ou apresentar baixa mortalidade e alta morbidade com poucos sinais clínicos quando ocasionada pelos outros sorovares paratíficos como Enteritidis, Typhimurium, Minnesota, Heidelberg entre outros (Swayne *et al.*, 2013).

Devido epidemiologia e patogenicidade complexa, sua ampla distribuição na natureza, com inúmeros reservatórios, sua habilidade de atravessar a barreira imunológica e não causar doença em aves, as salmonelas paratíficas tornaram-se um problema de difícil controle mesmo em granjas tecnificadas. Seu controle é importante devido perdas econômicas como restrições comerciais provenientes de países importadores da carne de frango, redução do desempenho zootécnico, aumento de condenações no abatedouro além de provocar gastroenterite em seres humanos (Vandeplas *et al.*, 2010).

A presente revisão tem como objetivos abordar particularidades, epidemiologia, patogenicidade, alterações na mucosa intestinal e formas de controle da *Salmonella enterica* em frangos.

2.4 GÊNERO *SALMONELLA* E EPIDEMIOLOGIA

A atual nomenclatura do grupo *Salmonella*, proposta em 1920 por Fritz Kauffmann e Philip Bruce White - conhecido como esquema Kauffmann-White - foi baseada nos antígenos de superfície presentes na *Salmonella* – moléculas que quando introduzidas nos tecidos de animais estimulam a produção de resposta específica. Nas células bacterianas, antígenos são geralmente encontrados em partes diferentes da estrutura celular. Antígenos da parede celular ou intracelulares são conhecidos como antígenos somáticos (O). Outros antígenos com diferentes especificidades fazem parte da estrutura da parede celular e do flagelo (H) de organismos móveis. Aquelas bactérias que possuem cápsula ou envelope possuem a terceira variedade de antígenos, os antígenos capsulares (Vi ou K) (Guthrie, 1991).

Atualmente o gênero é dividido em duas espécies *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica* cada uma contendo múltiplos sorovares. A *Salmonella enterica* apresenta ainda seis subespécies indicadas por números romanos e letras: I - *enterica*, II – *salamae*, IIIa - *arizonae*, IIIb - *diarizonae*, IV- *houtenae* e VI - *indica*. Em cada subespécie são reconhecidos

diferentes números de sorovares com base nos antígenos flagelares (H) e somáticos (O), perfazendo o total de 2.463 sorovares (Brenner *et al.*, 2000).

Aproximadamente 59% dos sorovares de salmonela pertencem ao grupo *Salmonella enterica* subespécie *enterica*. As cepas nesse grupo são responsáveis por cerca de 99% das infecções em pessoas e animais de sangue quente. Cepas da *S. bongori* e *S. enterica* subespécies *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *indica* e *houtenae* são geralmente isoladas de animais de sangue frio e ambiente, sendo raramente isoladas de pessoas (Brenner *et al.*, 2000).

Bactérias do gênero *Salmonella* constituem os patógenos de origem alimentar mais comuns em todo mundo, sendo os produtos de origem animal a principal fonte dessas toxinfecções. De acordo com o Centers for Disease Control and Prevention, estima-se que ocorram cerca de 1.2 milhões de casos de toxinfecção alimentar por *Salmonella* nos Estados Unidos, totalizando 19 mil hospitalizações e 380 mortes por ano (Scallan *et al.*, 2011). Em 2013 e 2014 foram notificados nos Estados Unidos 17 surtos de *Salmonella* relacionados com o consumo de vários tipos de alimentos como sementes de chia, caju, manteiga de amendoim e frango, além de contato com frango vivo em granjas ou aves criadas no fundo do quintal. Os principais sorovares envolvidos foram Enteritidis, Typhimurium, Heidelberg, Infantis, Hadar e Mbandaka (CDC, 2015). Em estudo realizado nos Estados Unidos com carcaças de frangos de corte os sorovares mais incidentes foram o Kentucky representando 59,5% dos isolados e o Typhimurium com 17,8% (Parveen *et al.*, 2007).

No Brasil, diferentes sorotipos de salmonelas paratíficas têm sido isolados de amostras de aves. De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária foi constatada a presença de *Salmonella* sp. em cerca de 2,7% das carcaças congeladas de frangos de corte em estudo realizado em 15 cidades brasileiras. O sorovar Enteritidis foi o mais incidente, representando 48,8% dos isolados, seguido do sorovar Infantis, com 7,6%, o sorovar Typhimurium com 7,2% e Heidelberg com 6,4%. O sorovar Minnesota representou cerca de 1,2 % dos isolados (Medeiros *et al.*, 2011).

Boni *et al.* (2011) verificaram a predominância dos sorotipos Typhimurium e Enteritidis em amostras coletadas de aviários e abatedouros de frangos de corte na região central do Mato Grosso do Sul. Mais recentemente, em amostras de suabe de arrasto provenientes de granjas do Paraná, os sorotipos mais frequentemente isolados foram Heidelberg, Mbandaka, Newport, Schwarzengrund, Enteritidis, Livingstone, Orion, Give e Infantis (Pandini *et al.*, 2015). Ainda, Voss-Rech *et al.* (2015) identificaram 50 sorotipos de *Salmonella* em amostras frangos de corte de todo Brasil, sendo a *Salmonella* Minnesota o

sorovar mais frequentemente isolado com 40,24% das amostras, seguido pelo sorovar Infantis com 14,63%, Heidelberg com 7,31%, Senftenberg com 6,09% e Mbandaka com 6,09% do total de amostras analisadas.

2.5 DOENÇA EM AVES

Aves infectadas com salmonelas paratíficas geralmente não apresentam nenhum sinal clínico, dificultando o diagnóstico a campo. Porém, *Salmonella* Pullorum (SP) e *Salmonella* Gallinarum (SG) causam doença em frangos, mas raramente são associadas com doenças em pessoas (Rettger e Harvey, 1980).

A *Salmonella* Pullorum causa a doença conhecida como pulorose, septicemia fatal ou diarreia branca e os sinais clínicos são observados principalmente em aves jovens. A *Salmonella* Gallinarum é responsável pelo tifo aviário e acomete aves de todas as idades, sendo frequentemente associada com aves adultas. Ambas podem ser transmitidas horizontalmente por contato direto com fezes e material contaminado e verticalmente contaminando a progênie através do ovo. São altamente prejudiciais aos hospedeiros causando sinais clínicos, mortalidade e morbidade significativas. Em ambos os casos as aves apresentam septicemia, fraqueza, depressão, redução no crescimento e diarreia (Swayne *et al.*, 2013).

A pulorose e o tifo aviário são controlados nas granjas comerciais no Brasil por meio de programas de biossegurança, manejo adequado, higiene, limpeza e monitoramento das produções comerciais. Em 1994, o Ministério da Agricultura implantou o Programa Nacional de Sanidade Avícola por meio da Portaria 193 de 1994 com o objetivo de monitorar, diagnosticar precocemente e reduzir a mortalidade de frangos por pulorose e tifo aviário (Brasil, 1994).

O paratifo aviário é causado por outros sorotipos, com exceção dos citados anteriormente, como por exemplo, *Salmonella* Enteritidis, *S. Typhimurium*, *S. Minnesota*, *S. Heidelberg*. Estes microrganismos acometem grande diversidade de hospedeiros, sendo os principais responsáveis por toxinfecção alimentares em seres humanos. São transmitidos horizontalmente e em aves os sinais clínicos geralmente são inaparentes, podendo ocorrer diarreia e redução no ganho de peso em frangos na primeira semana de vida. (Swayne *et al.*, 2013). A Portaria 193 de 1994 também obriga os estabelecimentos registrados a realizar o controle de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium. Mais recentemente, em 2013, a Portaria 10 do Ministério da Agricultura permitiu o uso de vacinas vivas para *Salmonella* Enteritidis para estabelecimentos avícolas considerados de maior susceptibilidade à

introdução e disseminação de agentes patogênicos no plantel avícola nacional como, por exemplo, granjas de postura comercial (Brasil, 2013).

Modelos matemáticos sugerem que o controle da *Salmonella* Gallinarum e da *Salmonella* Pullorum abriu um nicho favorável para o desenvolvimento da *Salmonella* Enteritidis, demonstrando que no passado a presença da *S. Gallinarum* excluiu a *S. Enteritidis* dos frangos (Rabsch *et al.*, 2000). Recentemente, com os plantéis livres de *S. Gallinarum*, o sorovar Enteritidis foi capaz de colonizar frangos, sem sinais aparentes de doença. Isso pode ser explicado devido ao fato de a *S. Gallinarum* e a *S. Enteritidis* possuírem semelhanças antigênicas, ambas pertencendo ao grupo D1, com mesma estrutura de lipopolissacarídeo e antígeno O9, competindo pelos mesmos sítios de ligação no hospedeiro (Rabsch *et al.*, 2000).

Muitos fatores são responsáveis pela colonização da *Salmonella* em frangos como idade e susceptibilidade genética, stress, imunossupressão, dose infectante, sorovar, competição com a microbiota por sítios de colonização e fatores de virulência (Foley *et al.*, 2011).

2.6 FATORES DE VIRULÊNCIA

A *Salmonella* entra no organismo da ave por via horizontal pela ingestão de água ou alimento contaminado, pela contaminação do ambiente, em especial a cama do aviário ou por contato com roedores e aves silvestres infectadas. A acidez estomacal reduz a quantidade do patógeno, entretanto as bactérias sobreviventes alcançam o lúmen intestinal onde infectam células epiteliais e disseminam-se para os demais órgãos através de células fagocíticas (López *et al.*, 2012). Nas células epiteliais, para o estabelecimento da infecção, a bactéria necessita passar por processos de adesão, invasão, formação e maturação do vacúolo e replicação (López *et al.*, 2012). Dessa forma, a patogenicidade da *Salmonella* está ligada a diversos fatores de virulência como lipopolissacarídeos (LPS), fímbrias, flagelos, enzimas e outros efeitos biológicos (Humphries *et al.*, 2005).

2.6.1 ADESÃO

O primeiro passo para a invasão da *Salmonella* no organismo é a adesão da bactéria nas células epiteliais da mucosa intestinal. Muitos fatores de virulência são responsáveis pelo processo de adesão como lipopolissacarídeos (LPS), flagelos e fímbrias (Shippy *et al.*, 2013).

O LPS é um dos componentes da membrana exterior de bactérias Gram-negativas, contribuindo para a integridade estrutural do microrganismo e protegendo a membrana de substâncias químicas como antibióticos (Raetz e Whitfield, 2002). Composto pelo antígeno O

(repetidas cadeias de monossacarídeos como galactose, ramnose e manose) e uma cadeia de oligossacarídeo que liga-se ao lipídio A (composto bioativo do LPS, também chamado de endotoxina) (Raetz e Whitfield, 2002). A resposta inflamatória nos animais inicia-se após o reconhecimento do LPS, sendo ele o responsável pelo desencadeamento do choque séptico (Munford, 2006). Microrganismos deficientes em lipopolissacarídeos são menos virulentos, possuem menor habilidade para colonizar o hospedeiro e são mais susceptíveis a antibióticos (Nevola *et al.*, 1985; Licht *et al.*, 1996; Delcour, 2009).

O flagelo é uma estrutura filamentar constituída basicamente de uma proteína chamada flagelina e participa da adesão e motilidade bacteriana (Stecher *et al.*, 2004). *Salmonellas* mutantes não flageladas mostram redução na capacidade de invasão e consequentemente na virulência (Van Asten *et al.*, 2004) e tem sido selecionadas com o intuito de produzir vacinas vivas contra a doença. *Salmonella Pullorum* e *Salmonella Gallinarum* diferem-se dos demais sorovares por não apresentarem flagelos, sendo imóveis, o que, no entanto, não reduz sua virulência.

As fímbrias são estruturas rígidas em forma de haste, localizadas na superfície da célula bacteriana que medeiam a ligação com as células hospedeiras. A adesão fimbrial é uma importante fase durante a infecção por *Salmonella* selecionando a célula alvo para a posterior invasão (Bäumler *et al.*, 1996). Esta adesão traz benefícios ao microrganismo, mas também representa um bom alvo para o reconhecimento do sistema imunológico do hospedeiro resultando em resposta celular com infiltração de linfócitos T e liberação de citocinas contra a subunidade fimbrial SefA, (Ogunniyi *et al.*, 1994). Diversos genes participam da regulação fimbrial e a atenuação de um desses genes não necessariamente compromete a adesão, resultando apenas em redução da virulência. Dessa forma observou-se que a atenuação simultânea nos operons *lpf* (long polar fimbriae), *pef* (plasmid encoded fimbriae) e *agf* (aggregative fimbriae) reduziu a virulência mais fortemente do que a inativação em separado (Van Der Velden *et al.*, 1998).

2.6.2 INVASÃO

Após a adesão, a *Salmonella* necessita ativar sua maquinaria e a expressão de algumas proteínas inicia-se com a translocação através do sistema de secreção tipo três (SSTT) da ilha de patogenicidade 1 (SPI-1) (Schlumberger e Hardt, 2006). O SSTT age como uma seringa molecular que transporta para dentro da célula do hospedeiro toxinas e proteínas efetoras que ocasionam o rearranjo do citoesqueleto celular, essencial para a entrada da bactéria na célula do hospedeiro (Galan e Wolf-Watz, 2006; Schlumberger e Hardt, 2006). O rearranjo do

citoesqueleto e a indução de resposta proinflamatória são atribuídos a diversos efetores. SopB participa da ativação de vias secretórias, facilitando a inflamação e estimulando a secreção de fluidos o que ocasiona diarreia (Wallis e Galyov, 2000). SipA, SipC e SopB interagem e causam distúrbio da actina do citoesqueleto (Wood *et al.*, 2000). Este distúrbio auxilia na entrada e internalização da *Salmonella* em um compartimento chamado vacúolo que impede a destruição da bactéria pelos fagolisossomos e é importante para sobrevivência e proliferação da *Salmonella* nas células do epitélio intestinal e macrófagos (Knodler *et al.*, 2010). Depois de internalizada na célula hospedeira, a *Salmonella* expressa um segundo tipo de SSTT codificado pela ilha de patogenicidade 2 (SPI-2) (Hensel, 2000). Este sistema é responsável pela secreção de diversas proteínas no vacúolo que interagem com o citoesqueleto formando filamentos, facilitando a fusão do vacúolo com outras vesículas na célula, além de auxiliar na replicação da bactéria (Hensel, 2000; Galan, 2001).

2.6.3 SOBREVIVÊNCIA NA CÉLULA HOSPEDEIRA

A capacidade da *Salmonella* de causar doença depende diretamente da sua habilidade de expressar genes de virulência que neutralizem as defesas do hospedeiro, por exemplo, ela é capaz de sobreviver e replicar não somente nos enterócitos, mas também nos macrófagos, as principais células de defesa do organismo (Hensel *et al.*, 1998). Além disso, ela deve sobreviver a outras limitações como privação de ferro e outros nutrientes enquanto no vacúolo (Foster e Spector, 1995).

A *Salmonella* necessita de ferro para seu crescimento e sobrevivência e em resposta a infecção, a disponibilidade de ferro é reduzida no hospedeiro. Um dos mecanismos utilizados pela bactéria é a captação e internalização de ferro em sideróforos, compostos com alta afinidade por ferro que capturam o mineral a partir da ferritina do hospedeiro (Wooldridge e Williams, 1993; Hantke *et al.*, 2003).

Fagócitos possuem diversas substâncias que tem a função de destruir o microrganismo fagocitado. Entre as principais substâncias podemos citar os intermediários de oxigênio reativo e intermediários de nitrogênio reativo (Shiloh *et al.*, 1999). A inibição dessas substâncias resulta na sobrevivência da *Salmonella* em ratos (Umezawa *et al.*, 1997) e o aumento da proliferação intracelular da *Salmonella* (Vazquez-Torres *et al.*, 2000).

O SSTT da SPI-2 está intimamente relacionado com a inibição de enzimas responsáveis pelo estresse oxidativo, translocando proteínas que impedem a ação enzimática no vacúolo com *Salmonella* (Chakravorty *et al.*, 2002).

Estudos indicam que a *Salmonella* utiliza grande variedade de nutrientes para sobreviver no interior da célula hospedeira como lipídios, carboidratos, aminoácido e pró-vitaminas, o que significa que a bactéria possui um grande número de genes responsáveis pela nutrição (Steeb *et al.*, 2013). Demonstrou-se que o crescimento intracelular da *Salmonella* é limitado pela disponibilidade de nutrientes e a bactéria prefere utilizar fonte de glicose para sua nutrição através da glicólise (Bowden *et al.*, 2014; Steeb *et al.*, 2013). Além disso, a *Salmonella* utiliza componentes sulfúricos, como o tetrionato, para sobreviver em condições anaeróbicas no intestino inflamado (Winter *et al.*, 2010).

Muitas das propriedades da *Salmonella* que contribuem para a sobrevivência intracelular e formação do vacúolo são controlados pelo sistema PhoP/PhoQ que permite que a bactéria responda a mudanças no ambiente e alterem a expressão gênica. Este sistema tem um papel importante na patogênese da *Salmonella*, como a sobrevivência em macrófagos, formação do vacúolo, aumento da resistência a defesa do hospedeiro como peptídeos antimicrobianos, baixo pH e alterações no lipídio A, componente do LPS, levando a redução ao estímulo de liberação de citocinas (Ernst *et al.*, 1999).

2.7 DINÂMICA CELULAR DO TRATO GASTRINTESTINAL DE FRANGOS

Microscopicamente o TGI constitui-se de diferentes camadas: 1) a mucosa mais internamente, constituída de epitélio, lâmina própria e muscular da mucosa; 2) submucosa, constituída de tecido conjuntivo; 3) muscular, constituída de uma camada muscular circular interna e uma camada muscular longitudinal externa e 4) serosa mais externamente, constituída de tecido conjuntivo (Junqueira e Carneiro, 2013).

A mucosa intestinal apresenta as criptas, locais de proliferação celular e vilosidades, projeções digitiformes que aumentam a superfície de absorção constituídas basicamente de 3 tipos celulares: 1) os enterócitos, responsáveis pela absorção dos nutrientes; 2) as células enteroendócrinas, produtoras de hormônios peptídicos e monoaminas biogênicas que participam da regulação da digestão e 3) as células caliciformes, que secretam glicoproteínas que protegem a mucosa intestinal (Junqueira e Carneiro, 2013).

A mucosa intestinal é o primeiro sítio alvo da *Salmonella* no hospedeiro invadindo o epitélio intestinal, lâmina própria e sobrevivendo em macrófagos (Berndt *et al.*, 2007; Fields *et al.*, 1986). A *Salmonella* Enteritidis foi observada 12 h após sua inoculação na lâmina própria do ceco de aves desafiadas ao 1º dia de vida, atingindo o pico aos 2 dias após inoculação (Van Immerseel *et al.*, 2002). A capacidade de invadir o epitélio e a lâmina própria do ceco de frangos pode variar entre sorotipos de *Salmonella*. O sorovar Enteritidis,

por exemplo, apresenta maior capacidade de invadir a lâmina própria, sorovares Typhimurium e Hadar apresentam moderada capacidade invasiva e o sorovar Infantis baixa capacidade, sendo comumente encontrado nas células epiteliais, mas raramente encontrado na lâmina própria (Berndt *et al.*, 2007).

A mucosa intestinal também participa da defesa contra patógenos. As células caliciformes tem importante papel na imunidade inata, pois são produtoras de mucina, a primeira molécula a ter contato com o patógeno, interagindo com a superfície celular da bactéria e impedindo a ligação na célula hospedeira (Kim e Khan, 2013). No caso de infecções por *Salmonella* a produção de mucina pelas células caliciformes é influenciada pelo receptor sinalizador IFN- γ que tem a finalidade de proteger o epitélio intestinal e também controlar a disseminação sistêmica do patógeno (Songhet *et al.*, 2011). A infecção por *Salmonella* Typhimurium em aves também causa aumento da densidade de células caliciformes na mucosa do jejuno, reduzindo a proporção de enterócitos e consequentemente prejudicando a absorção de nutrientes (Almeida *et al.*, 2014; Fasina *et al.*, 2010).

A habilidade da *Salmonella* em persistir e multiplicar nos macrófagos do hospedeiro é essencial para a patogênese e sua disseminação (Braukmann *et al.*, 2015; García-Del Portillo, 2001), no entanto os macrófagos também participam do processo de eliminação da bactéria. Kramer *et al.*, 2003 demonstraram em estudos *in vitro* que ocorre redução no número de bactérias internalizadas após 48 h, porém apenas 20% da *Salmonella* internalizada foi capaz de sobreviver nos macrófagos.

Os linfócitos T participam da resposta imunológica frente a *Salmonella* e são classificados em 2 subgrupos: receptor celular $\alpha\beta$ e receptor celular $\gamma\delta$, que dão origem as células CD4⁺ (auxiliares) e CD8⁺ (citotóxicos). Células T $\alpha\beta$ são adicionalmente subdivididas em células V β ₁ e V β ₂ (Berndt *et al.*, 2006).

Van Immerseel *et al.* (2002) sugerem que no caso da resposta imunológica contra *Salmonella*, ocorre inicialmente uma resposta inflamatória não específica, responsável pela retirada da bactéria da lâmina própria e reduzindo assim a entrada na corrente sanguínea, sendo os macrófagos as principais células responsáveis por este processo. Após, a presença de células T irá conferir uma resposta imune específica.

A infecção por diferentes sorotipos pode influenciar na dinâmica das células imunológicas na mucosa intestinal. Berndt *et al.*, 2007 observaram influxo de granulócitos e linfócitos T $\gamma\delta$ na lâmina própria de ceco de aves desafiadas com os sorovares Typhimurium, Hadar e Enteritidis e em menor proporção o sorovar Infantis, 1-2 dias após inoculação. De 2 a

9 dias após infecção observou-se aumento de células CD4+ no ceco das aves, em todos os sorovares avaliados.

Inúmeros estudos abordam a dinâmica celular e resposta imunológica no TGI, porém os resultados são controversos, bem como os métodos de avaliação utilizados. Aumento na quantidade de macrófagos, linfócitos T e linfócitos B foi observado respectivamente 3, 24 e 48 h após desafio com *Salmonella* Enteritidis no ceco de frangos por meio de imunoistoquímica (Van Immerseel *et al.*, 2002). Crescente proliferação de células CD3+, CD4+ e macrófagos foi observado no ceco aos 7 e 21 dias após desafio de aves com *S. Enteritidis*, porém, por meio de imunoistoquímica, observou-se redução de CD3+, CD4+ e CD8+ no baço das aves 7 e 14 dias após desafio (Asheg *et al.*, 2002). Sasai *et al.*, 2000 utilizando citometria de fluxo observaram aumento de linfócitos CD4+ e linfócitos B e redução de linfócitos CD3+ e CD8+ na tonsila cecal de aves desafiadas com *S. Enteritidis*. Aves desafiadas com *S. Enteritidis* apresentaram redução nas células imunológicas no sangue periférico por análise de citometria de fluxo e aumento de células CD3+ na mucosa intestinal por meio de imunoistoquímica (Pickler *et al.*, 2012). Quando se compara sangue periférico por meio de citometria de fluxo e tecidos por meio de imunoistoquímica em aves desafiadas com *Salmonella*, em geral observa-se redução nas células imunológicas no sangue e aumento destas células em órgãos alvo indicando migração dessas células para os sítios de infecção. (Beirao *et al.*, 2012; Pickler *et al.*, 2013).

Estas alterações celulares também são acompanhadas por alterações na produção de citocinas, proteínas secretadas por células que tem importante papel na ativação e regulação celular durante resposta imunológica e processos inflamatórios (Wigley e Kaiser, 2003). Aves desafiadas com *S. Enteritidis* no primeiro dia de vida apresentaram aumento de IL-1 β , IL-8, IL-17, IL-18, IL-22, IFN- γ , e iNOS no ceco de 3 a 10 dias após inoculação (Crhanova *et al.*, 2011). Aumento de IL-8 e K60 às 6, 12, 24 e 48 h após desafio também foi observado em aves desafiadas com *S. Typhimurium*, o que resultou em pronunciado influxo de heterofilos na lâmina própria do ceco, dando início ao processo inflamatório (Withanage *et al.*, 2004). Aumento de IFN- γ foi observado no fígado, íleo e tonsila cecal aos 3, 7 e 14 dias após inoculação com *S. Typhimurium*. Este aumento coincidiu com a presença de lesões e de linfócitos T CD8+ e CD4+ no fígado (Withanage *et al.*, 2005). Da mesma forma, o aumento de IL-2 coincidiu com aumento de células CD4+ no ceco de frangos desafiados (Berndt *et al.*, 2007).

A produção de citocinas também está correlacionada com a capacidade invasiva dos diferentes sorovares de *Salmonella*. A invasão causada *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*

ocasiona forte resposta inflamatória, com aumento na expressão de IL-6 o que limita a disseminação da bactéria ao trato gastrointestinal. Já a infecção por *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* resulta em fraca resposta inflamatória com baixa expressão de IL-6 ocasionando a disseminação sistêmica da bactéria (Kaiser *et al.*, 2000).

O equilíbrio dos componentes celulares do TGI reflete diretamente na saúde da ave, seja com o intuito de impedir a entrada e permanência de patógenos por meio da produção de mucina pelas células caliciformes e atuação de macrófago ou na eliminação por meio da ação de linfócitos T.

2.8 CONTROLE DA *SALMONELLA* EM FRANGOS

Existem várias dificuldades associadas com o controle e erradicação das salmonelas. Em primeiro lugar, a bactéria possui epidemiologia e patogenicidade complexa. Além disso, a ocorrência de salmonela paratífica tem pouco ou nenhum impacto na produtividade das granjas e os programas de controle e erradicação são complexos e de custo elevado. (Silva e Duarte, 2002).

Dentre as formas de controle da *Salmonella* nos plantéis avícolas podemos citar a implantação de medidas básicas de biosseguridade. Biosseguridade é definida pela Organização Internacional de Epizootias (OIE), como o conjunto de procedimentos que visam prevenir ou controlar a contaminação dos rebanhos por agentes ou doenças infecciosas que afetam a produtividade destes ou a saúde dos consumidores de produtos de origem animal. Em termos práticos, a implantação de um programa de biosseguridade inicia-se com a avaliação dos riscos da granja como verificação da presença de vetores como insetos, roedores, aves silvestres ou possíveis fontes de contaminação como água, ração, pessoas, veículos, dejetos avaliando de uma forma geral as condições ambientais da granja (Filho, 2007).

A abrangência do plano de biosseguridade compreende desde as instalações, localização, isolamento da propriedade e proximidade com outras criações, além da presença de cercas, equipamentos adequados e por fim práticas adequadas de manejo como limpeza, desinfecção, vacinação e medicações (Filho, 2007).

De acordo com a FDA (Food and Drug Administration), antibióticos são utilizados no controle, prevenção e tratamento de doenças, além de melhoradores de desempenho na produção avícola. Quando utilizados na prevenção de doenças e como melhoradores de desempenho são administrados em baixas dosagens na água de bebida ou alimento, inibindo o metabolismo bacteriano e reduzindo a competição por nutrientes entre bactérias e hospedeiro.

Porém, sugere-se que a administração dos antibióticos em baixas dosagens poderia levar ao desenvolvimento da resistência aos antibióticos e existe hoje uma forte restrição ao uso destas substâncias na produção avícola.

Visando controlar a salmonelose nos plantéis avícolas, as empresas produtoras de aves buscam alternativas aos antibióticos disponíveis no mercado e mostram-se promissores no controle da *Salmonella* os ácidos orgânicos, probióticos, prébióticos, aditivos fitogênicos e vacinas (Kilroy *et al.*, 2015; Nandre *et al.*, 2011).

Ácidos orgânicos são substâncias que contém uma ou mais carboxilas em sua molécula. Nesta classificação podem ser incluídos os aminoácidos e os ácidos graxos. Em geral quando se fala em ácidos orgânicos utilizados na alimentação animal faz-se referência aos ácidos fracos de cadeia curta que produzem menor quantidade de prótons por molécula ao se dissociarem (Dibner e Buttin, 2002). Os ácidos orgânicos exercem sua atividade antimicrobiana por reduzirem o pH no interior da célula microbiana afetando o metabolismo celular (Russell, 1992) ou por alterar a integridade da membrana plasmática do microrganismo (Stratford *et al.*, 2009). Estudos relatam melhora no desempenho zootécnico (Viola *et al.*, 2008) redução da contaminação por *Salmonella* (Fernandez-Rubio *et al.*, 2009; Zaki *et al.*, 2015) e imunomodulação (Flores *et al.*, 2012; Pickler *et al.*, 2012) com uso de diferentes combinações de ácido láctico, acético, fumárico, fórmico e butírico.

Aditivos fitogênicos são substâncias aromáticas obtidas de plantas como orégano, pimenta, canela, cravo, alho etc. (Brenes e Roura, 2010). A ação antimicrobiana dos aditivos fitogênicos pode ser atribuída ao seu caráter lipofílico, tornando-se capazes de penetrar na célula bacteriana ou desintegrar sua membrana celular (Applegate *et al.*, 2010). Inúmeros aditivos fitogênicos apresentaram propriedades antimicrobiana, anticoccidiana, fungicida e antioxidante (Amerah *et al.*, 2012; Bona *et al.*, 2012; Pickler *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2015). Estudos *in vitro* de Hernández *et al.* demonstraram a inibição de bactérias Gram-negativas, como *E. coli* e *Salmonella enterica* pelo uso de carvacrol, timol e cinamaldeído. Além disso, os aditivos fitogênicos podem contribuir no processo digestivo auxiliando na liberação de enzimas digestivas (Lee *et al.*, 2003; Hashemipour *et al.*, 2013).

Probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas trazem benefícios à saúde do hospedeiro. Seu mecanismo de ação já foi extensivamente revisado em diversas publicações (Gupta e Garg, 2009; Oelschlaeger, 2010; Bermudez-Brito *et al.*, 2012) estando entre eles a manutenção da integridade da barreira intestinal, exclusão competitiva devido inibição da adesão de microrganismos patogênicos e competição por substratos no TGI, produção de substâncias antimicrobianas como

bacteriocinas e imunomodulação (Bermudez-Brito *et al.*, 2012). Em aves são relatados efeitos positivos no desempenho zootécnico (Zhang e Kim, 2014), controle de microrganismos patogênicos como *Campylobacter jejuni* (Ghareeb *et al.*, 2012) *Clostridium perfringens* e *Eimeria* (Lee *et al.*, 2015) e diversos sorovares de *Salmonella enterica* além de regulação da resposta imunológica (Knap *et al.*, 2011; Kuritza *et al.*, 2013; Lourenço *et al.*, 2013).

Na indústria avícola os prebióticos utilizados predominantemente são os fruto-oligossacarídeos, manano-oligossacarídeos, oligofrutose e inulina (Roberts *et al.*, 2015). São definidos como carboidratos não digeríveis que atuam benéficamente na microbiota intestinal do hospedeiro (Gaggia *et al.*, 2010), mostrando-se eficazes na modulação da microbiota intestinal, promovendo seletivamente o aumento de bactérias benéficas (Roberts *et al.*, 2015) e redução de patogênicas como *Salmonella* Typhimurium e *E. coli* (Santana *et al.*, 2014). A inclusão de manano-oligossacarídeos na dieta de aves comerciais reduziu a contaminação por *Salmonella* Enteritidis (Donalson *et al.*, 2008) e a inclusão de fruto-oligossacarídeos reduziu a população de *Clostridium perfringens* e *E. coli* e aumentou a população de *Lactobacillus* (Kim *et al.*, 2011). A literatura também associa o uso de prebióticos com a modulação da resposta imunológica (Janardhana *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011; Lourenço *et al.*, 2015).

Juntamente com um bom programa de biossegurança, vacinas mortas ou vivas podem ser efetivas para prevenção de *Salmonella* em aves (Paiva *et al.*, 2009). Vacinas mortas são consideradas mais seguras, pois não ocorre reversão de virulência, podem ser aplicadas em larga escala e não se disseminam no ambiente, porém a imunidade não é transmitida para a progênie (Mccapes *et al.*, 1967) e elas são rapidamente eliminadas do organismo, levando a imunidade pouco duradoura (Barrow *et al.*, 1991). No entanto vacinas vivas resultam em melhor proteção por induzirem a imunidade celular e humoral e no caso da vacina contra *Salmonella* Gallinarum também ocorre proteção cruzada contra a *Salmonella* Enteritidis (Barrow *et al.*, 1991; Penha Filho *et al.*, 2010). Vacinas ainda se mostram efetivas na redução da mortalidade (Paiva *et al.*, 2009), redução da contaminação de carcaças no abatedouro (Berghaus *et al.*, 2011; Dorea *et al.*, 2010), redução da excreção fecal da bactéria (Kilroy *et al.*, 2015) e redução da contaminação da gema do ovo no oviduto de galinhas (De Buck *et al.*, 2004).

2.9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Existem hoje cerca de 2500 sorovares de *Salmonella* que são responsáveis por 1.2 milhões de casos de toxinfecção alimentar em seres humanos. A doença septicêmica em aves é ocasionada principalmente pelos sorovares Gallinarum e Pullorum, porém as salmonelas

paratíficas, que geralmente não cursam com sinais clínicos e mortalidade nos animais são aquelas de maior importância na saúde pública.

A principal via de infecção da *Salmonella* é a fecal-oral. Uma vez no hospedeiro, o microrganismo deve sobreviver ao pH ácido do proventrículo e à imunidade inata, como o muco produzido pelas células caliciformes, e colonizar o ceco da ave. A bactéria compete com a microbiota intestinal para fazer contato com os enterócitos e colonizar o trato gastrointestinal. A adesão é facilitada pela presença do lipopolissacarídeo, fímbrias e flagelos e uma vez aderida ao epitélio intestinal, a *Salmonella* expressa o SSTT, uma estrutura semelhante a uma agulha que injeta toxinas e outras proteínas para dentro da célula facilitando a internalização da *Salmonella* em um vacúolo que impede sua destruição. O vacúolo auxilia na sobrevivência e proliferação da bactéria nas células intestinais e macrófagos. Dentro deste compartimento são secretadas proteínas importantes na patogênese e replicação da *Salmonella*.

A dinâmica celular no trato gastrointestinal de frangos está diretamente relacionada com a imunidade frente a *Salmonella*. O equilíbrio entre enterócitos e as células caliciformes, macrófagos e linfócitos T na mucosa intestinal é fundamental para a saúde da ave.

O controle da *Salmonella* em frangos visa basicamente impedir a entrada deste microrganismo na cadeia alimentar, evitando surtos de gastroenterite em seres humanos. Para isso a indústria deve utilizar além de um bom programa de biossegurança, ferramentas como ácidos orgânicos, aditivos fitogênicos, probióticos, prebióticos e vacinas.

Por fim, a compreensão da epidemiologia, dos fatores de virulência da *Salmonella* e das alterações ocasionadas na dinâmica celular do trato gastrointestinal de frangos é imprescindível para o entendimento da salmonelose e para o desenvolvimento de ferramentas adequadas no controle desta enfermidade de forma a evitar a entrada deste microrganismo na cadeia alimentar.

2.10 REFERÊNCIAS

Almeida, J.A.; Ponnuraj, N.P.; Lee, J.J.; Utterback, P.; Gaskins, H.R.; Dilger, R.N.; Pettigrew, J.E. Effects of dietary clays on performance and intestinal mucus barrier of broiler chicks challenged with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and on goblet cell function in vitro. **Poultry Science**, v. 93, n. 4, p. 839-847, 2014.

Amerah, A.M.; Mathis, G.; Hofacre, C.L. Effect of xylanase and a blend of essential oils on performance and *Salmonella* colonization of broiler chickens challenged with *Salmonella* Heidelberg. **Poultry Science**, v. 91, n. 4, p. 943-947, 2012.

Applegate, T.J.; Klose, V.; Steiner, T.; Ganner, A. Schatzmayr, G. Probiotics and phytogenics for poultry: Myth or reality? **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 19, n. 2, p. 194-210, 2010.

Asheg, A.; Levkut, M.; Revajova, V.; Sevcikova, Z.; Kolodzieyski, L.; Pistl, J. T lymphocyte subpopulations and B lymphocyte cells in caecum and spleen of chicks infected with *Salmonella* Enteritidis. **Acta Histochemica**, v. 104, n. 4, p. 435-439, 2002.

Barrow, P.A.; Lovell, M.A.; Berchieri, A. The use of two live attenuated vaccines to immunize egg-laying hens against *Salmonella* Enteritidis phage type 4. **Avian Pathology**, v. 20, n. 4, p. 681-692, 1991.

Bäumler, A.J.; Tsolis, R.M.; Heffron, F. Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella* Typhimurium. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 5, p. 1862-1865, 1996.

Beirao, B.C.; Favaro, C., Jr.; Nakao, L.S.; Caron, L.F.; Zanata, S.M.; Mercadante, A.F. Flow cytometric immune profiling of specific-pathogen-free chickens before and after infectious challenges. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 145, n. 1-2, p. 32-41, 2012.

Berghaus, R.D.; Thayer, S.G.; Maurer, J.J.; Hofacre, C.L. Effect of vaccinating breeder chickens with a killed *Salmonella* vaccine on *Salmonella* prevalences and loads in breeder and broiler chicken flocks. **Journal of Food Protection**, v. 74, n. 5, p. 727-734, 2011.

Bermudez-Brito, M.; Plaza-Diaz, J.; Munoz-Quezada, S.; Gomez-Llorente, C.; Gil, A. Probiotic mechanisms of action. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 61, n. 2, p. 160-174, 2012.

Berndt, A.; Pieper, J.; Methner, U. Circulating gamma delta T cells in response to *Salmonella enterica* serovar Enteritidis exposure in chickens. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 7, p. 3967-3978, 2006.

Berndt, A.; Wilhelm, A.; Jugert, C.; Pieper, J.; Sachse, K.; Methner, U. Chicken cecum immune response to *Salmonella enterica* serovars of different levels of invasiveness. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 12, p. 5993-6007, 2007.

Bona, T.D.M.M.; Pickler, L.; Miglino, L.B.; Kuritza, L.N.; Vasconcelos, S.P.; Santin, E. Óleo essencial de orégano, alecrim, canela e extrato de pimenta no controle de *Salmonella*, *Eimeria* e *Clostridium* em frangos de corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. p. 411-418, 2012.

Boni, H.; Carrijo, A.; Fascina, V. Ocorrência de "*Salmonella*" spp. em aviários e abatedouro de frangos de corte na região central de Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.12, n. 1, p. 84-95, 2011.

Bowden, S.D.; Hopper-Chidlaw, A.C.; Rice, C.J.; Ramachandran, V.K.; Kelly, D.J.; Thompson, A. Nutritional and metabolic requirements for the infection of HeLa cells by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. 962-966, 2014.

Braukmann, M.; Methner, U.; Berndt, A. Immune reaction and survivability of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Infantis after infection of primary avian macrophages. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. 1225-1240, 2015.

Brasil. Portaria 193, de 9 de setembro de 1994. Institui o Programa Nacional de Sanidade Avícola e cria o Comitê consultivo do programa. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**, 1994.

Brasil. Instrução Normativa 10, de 11 de abril de 2013. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**, 2013.

Brenes, A.; Roura, E. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. **Animal Feed Science and Technology**, v. 158, n. 1, p. 1-14, 2010.

Brenner, F.W.; Villar, R.G.; Angulo, F.J.; Tauxe, R.; Swaminathan, B. *Salmonella* Nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 7, p. 2465-2467, 2000.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. Persons infected with the outbreak strains of *Salmonella* Enteritidis, Hadar, Indiana, Muenchen or Muenster, by state of residence, as of September 23, 2015. Available in <http://www.cdc.gov/salmonella/live-poultry-07-15/map.html>. Access in January, 5th, 2016.

Chakravorty, D.; Hansen-Wester, I.; Hensel, M. *Salmonella* pathogenicity island 2 mediates protection of intracellular *Salmonella* from reactive nitrogen intermediates. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 195, n. 9, p. 1155-1166, 2002.

Crhanova, M.; Hradecka, H.; Faldynova, M.; Matulova, M.; Havlickova, H.; Sisak, F.; Rychlik, I. Immune response of chicken gut to natural colonization by gut microflora and to *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection. **Infection and Immunology**, v. 79, p. 2011.

De Buck, J.; Van Immerseel, F.; Haesebrouck, F.; Ducatelle, R. Effect of type 1 fimbriae of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis on bacteraemia and reproductive tract infection in laying hens. **Avian Pathology**, v. 33, n. 3, p. 314-320, 2004.

Delcour, A.H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1794, n. 5, p. 808-816, 2009.

Dibner, J.J. e Buttin, P. Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism. **Journal of Applied Poultry Research**, v.11, p. 453-463, 2002.

Donalson, L.M.; McCreynolds, J.L.; Kim, W.K.; Chalova, V.I.; Woodward, C.L.; Kubena, L.F.; Nisbet, D.J.; Ricke, S.C. The influence of a fructooligosaccharide prebiotic combined with alfalfa molt diets on the gastrointestinal tract fermentation, *Salmonella enteritidis* infection, and intestinal shedding in laying hens. **Poultry Science**, v. 87, n. 7, p. 1253-1262, 2008.

Dorea, F.C.; Cole, D.J.; Hofacre, C.; Zamperini, K.; Mathis, D.; Doyle, M.P.; Lee, M.D.; Maurer, J.J. Effect of *Salmonella* vaccination of breeder chickens on contamination of broiler chicken carcasses in integrated poultry operations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 23, p. 7820-7825, 2010.

Ernst, R.K.; Guina, T.; Miller, S.I. How intracellular bacteria survive: surface modifications that promote resistance to host innate immune responses. **Journal of Infectious Diseases**, v. 179, n. 2, p. 326-330, 1999.

Fasina, Y.O.; Hoerr, F.J.; McKee, S.R.; Conner, D.E. Influence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection on intestinal goblet cells and villous morphology in broiler chicks. **Avian Disease**, v. 54, n. 2, p. 841-847, 2010.

Fernandez-Rubio, C.; Ordonez, C.; Abad-Gonzalez, J.; Garcia-Gallego, A.; Honrubia, M.P.; Mallo, J.J.; Balana-Fouce, R. Butyric acid-based feed additives help protect broiler chickens from *Salmonella* Enteritidis infection. **Poultry Science**, v. 88, n. 5, p. 943-948, 2009.

Fields, P.I.; Swanson, R.V.; Haidaris, C.G.; Heffron, F. Mutants of *Salmonella* Typhimurium that cannot survive within the macrophage are avirulent. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 14, p. 5189-5193, 1986.

Filho, R.L.A. Prevenção de doenças: Biosseguridade em Avicultura, São Paulo, p. 2007.

Flores, F.; Lovato, M.; Wilsmann, C.G.; Gazoni, F.L.; Silveira, F.; Caron, L.F.; Beirão, B.C.B. Comportamento de células do sistema imune frente ao desafio com *Salmonella* Enteritidis em aves tratadas e não tratadas com ácidos orgânicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. p. 495-502, 2012.

Foley, S.L.; Nayak, R.; Hanning, I.B.; Johnson, T.J.; Han, J.; Ricke, S.C. Population dynamics of *Salmonella enterica* serotypes in commercial egg and poultry production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 13, p. 4273-4279, 2011.

Foster, J.W.; Spector, M.P. How *Salmonella* survive against the odds. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, n. p. 145-174, 1995.

Gaggia, F.; Mattarelli, P.; Biavati, B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 31, n. 141, p. 10, 2010.

Galan, J.E. *Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 17, n. p. 53-86, 2001.

Galan, J.E.; Wolf-Watz, H. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. **Nature**, v. 444, n. 7119, p. 567-573, 2006.

García-Del Portillo, F. *Salmonella* intracellular proliferation: where, when and how? **Microbes and Infection**, v. 3, n. 14-15, p. 1305-1311, 2001.

Ghareeb, K.; Awad, W.A.; Mohnl, M.; Porta, R.; Biarnés, M.; Böhm, J. Schatzmayr, G. Evaluating the efficacy of an avian-specific probiotic to reduce the colonization of *Campylobacter jejuni* in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 91, n. 8, p. 1825-1832, 2012.

Gupta, V.; Garg, R. Probiotics. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 202-209, 2009.

Guthrie, R.K. *Salmonella*, **Taylor & Francis**, p. 240, 1991.

Hantke, K.; Nicholson, G.; Rabsch, W.; Winkelmann, G. Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor Iron. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 7, p. 3677-3682, 2003.

Hashemipour, H.; Kermanshahi, H.; Golian, A.; Veldkamp, T. Effect of thymol and carvacrol feed supplementation on performance, antioxidant enzyme activities, fatty acid composition, digestive enzyme activities, and immune response in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 92, n. 8, p. 2059-2069, 2013.

Hensel, M. *Salmonella* pathogenicity island 2. **Molecular Microbiology**, v. 36, n. 5, p. 1015-1023, 2000.

Hensel, M.; Shea, J.E.; Waterman, S.R.; Mundy, R.; Nikolaus, T.; Banks, G.; Vazquez-Torres, A.; Gleeson, C.; Fang, F.C.; Holden, D.W. Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. **Molecular Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 163-174, 1998.

Hernández, F.; Madrid, J.; García, V.; Orengo, J. Megías, M.D. Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. **Poultry Science**, v. 83, n. 2, p. 169-174, 2004.

Humphries, A.; Deridder, S.; Bäumler, A.J. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium fimbrial proteins serve as antigens during infection of mice, **Infection and Immunity**, v. 73, n. 9, p. 5329-5338, 2005.

Janardhana, V.; Broadway, M.M.; Bruce, M.P.; Lowenthal, J.W.; Geier, M.S.; Hughes, R.J.; Bean, A.G.D. Prebiotics modulate immune responses in the gut-associated lymphoid tissue of chickens. **The Journal of Nutrition**, v. 139, n. 7, p. 1404-1409, 2009.

Junqueira, L.C.; Carneiro, J. Trato Digestivo. In: Junqueira, L.C.; Carneiro, J. **Histologia Básica**. 12^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 280-310, 2013.

Kaiser, P.; Rothwell, L.; Galyov, E.E.; Barrow, P.A.; Burnside, J.; Wigley, P. Differential cytokine expression in avian cells in response to invasion by *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Gallinarum. **Microbiology**, v. 146, n. 12, p. 3217-3226, 2000.

Kilroy, S.; Raspoet, R.; Devloo, R.; Haesebrouck, F.; Ducatelle, R.; Van Immerseel, F. Oral administration of the *Salmonella* Typhimurium vaccine strain Nal2/Rif9/Rtt to laying hens at day of hatch reduces shedding and caecal colonization of *Salmonella* 4,12:i:-, the monophasic variant of *Salmonella* Typhimurium. **Poultry Science**, v. 94, n. 6, p. 1122-1127, 2015.

Kim, G.B.; Seo, Y.M.; Kim, C.H.; Paik, I.K. Effect of dietary prebiotic supplementation on the performance, intestinal microflora, and immune response of broilers. **Poultry Science**, v. 90, n. 1, p. 75-82, 2011.

Kim, J.; Khan, W. Goblet cells and mucins: Role in innate defense in enteric infections. **Pathogens**, v. 2, n. 1, p. 55, 2013.

Knap, I.; Kehlet, A.B.; Bennedsen, M.; Mathis, G.F.; Hofacre, C.L.; Lumpkins, B.S.; Jensen, M.M.; Raun, M.; Lay, A. *Bacillus subtilis* (DSM17299) significantly reduces *Salmonella* in broilers. **Poultry Science**, v. 90, n. 8, p. 1690-1694, 2011.

Knodler, L.A.; Vallance, B.A.; Celli, J.; Winfree, S.; Hansen, B.; Montero, M.; Steele-Mortimer, O. Dissemination of invasive *Salmonella* via bacterial-induced extrusion of mucosal epithelia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 41, p. 17733-17738, 2010.

Kramer, J.; Visscher, A.H.; Wagenaar, J.A.; Jeurissen, S.H.M. Entry and survival of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis PT4 in chicken macrophage and lymphocyte cell lines. **Veterinary Microbiology**, v. 91, n. 2-3, p. 147-155, 2003.

Kreig, N.R. Holt, J.G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Baltimore, p. 1984.

Kuritza, L.N.; Lourenço, M.C.; Miglino, L.B.; Pickler, L.; Kraieski, L.A.; Santin, E. Effects of *Enterococcus faecium* on diet in the dynamics of CD4+ and CD8+ cell infiltration in the intestinal mucosa of broilers challenged with *Salmonella* Minnesota. **International Journal of Poultry Science**, v. 12, n. 9, p. 523-528, 2013.

Lee, K.-W.; Kim, D.K.; Lillehoj, H.S.; Jang, S.I.; Lee, S.H. Immune modulation by *Bacillus subtilis*-based direct-fed microbials in commercial broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, v. 200, n. 0, p. 76-85, 2015.

Lee, K.W.; Everts, H.; Kappert, H.J.; Frehner, M.; Losa, R.; Beynen, A.C. Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 44, n. 3, p. 450-457, 2003.

Licht, T.R.; Krogfelt, K.A.; Cohen, P.S.; Poulsen, L.K.; Urbance, J.; Molin, S. Role of lipopolysaccharide in colonization of the mouse intestine by *Salmonella* Typhimurium studied by in situ hybridization. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 9, p. 3811-3817, 1996.

López, F.E.; De Las Mercedes Pescaretti, M.; Morero, R.; Delgado, M.A. *Salmonella* Typhimurium general virulence factors: A battle of David against Goliath? **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 842-851, 2012.

Lourenço, M.C.; Kuritza, L.N.; Hayashi, R.M.; Miglino, L.B.; Durau, J.F.; Pickler, L.; Santin, E. Effect of a mannanoligosaccharide-supplemented diet on intestinal mucosa T lymphocyte populations in chickens challenged with *Salmonella* Enteritidis. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 24, n. 1, p. 15-22, 2015.

Lourenço, M.C.; Kuritza, L.N.; Westphal, P.; Miglino, L.B.; Pickler, L.; Kraieski, A.L.; Santin, E. Uso de probiótico sobre a ativação de células T e controle de *Salmonella* Minnesota em frangos de corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. p. 11-14, 2013.

Mccapes, R.H.; Coffland, R.T.; Christie, L.E. Challenge of turkey poultts originating from hens vaccinated with *Salmonella* typhimurium bacterin. **Avian Diseases**, v. 11, n. 1, p. 15-24, 1967.

Medeiros, M.A.; Oliveira, D.C.; Rodrigues Ddos, P.; Freitas, D.R. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. **Revista Panamena de Salud Publica**, v. 30, n. 6, p. 555-560, 2011.

Munford, R.S. Severe sepsis and septic shock: the role of gram-negative bacteremia. **Annual Review of Pathology**, v. 1, n. p. 467-496, 2006.

Nandre, R.M.; Chaudhari, A.A.; Matsuda, K.; Lee, J.H. Immunogenicity of a *Salmonella* Enteritidis mutant as vaccine candidate and its protective efficacy against salmonellosis in chickens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 144, n. 3-4, p. 299-311, 2011.

Nevola, J.J.; Stocker, B.A.; Laux, D.C.; Cohen, P.S. Colonization of the mouse intestine by an avirulent *Salmonella* Typhimurium strain and its lipopolysaccharide-defective mutants. **Infection and Immunity**, v. 50, n. 1, p. 152-159, 1985.

Oelschlaeger, T.A. Mechanisms of probiotic actions - A review. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 1, p. 57-62, 2010.

Ogunniyi, A.D.; Manning, P.A.; Kotlarski, I. A *Salmonella* Enteritidis 11RX pilin induces strong T-lymphocyte responses. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 12, p. 5376-5383, 1994.

Paiva, J.B.D.; Penha Filho, R.a.C.; Argüello, Y.M.S.; Silva, M.D.D.; Gardin, Y.; Resende, F.; Berchieri Junior, A.; Sesti, L. Efficacy of several *Salmonella* vaccination programs against experimental challenge with *Salmonella* Gallinarum in commercial brown layer and broiler breeder hens. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 11, n. p. 65-72, 2009.

Pandini, J.A.; Pinto, F.G.D.S.; Muller, J.M.; Weber, L.D.; Moura, A.C.D. Ocorrência e perfil de resistencia antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de aviários do Paraná, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, p. 1-6, 2015.

Parveen, S.; Taabodi, M.; Schwarz, J.G.; Oscar, T.P.; Harter-Dennis, J.; White, D.G. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* recovered from processed poultry. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 11, p. 2466-2472, 2007.

Penha Filho, R.A.; De Paiva, J.B.; Da Silva, M.D.; De Almeida, A.M.; Berchieri, A., Jr. Control of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Gallinarum in birds by using live vaccine candidate containing attenuated *Salmonella* Gallinarum mutant strain. **Vaccine**, v. 28, n. 16, p. 2853-2859, 2010.

Pickler, L.; Beirao, B.C.B.; Hayashi, R.M.; Durau, J.F.; Lourenco, M.C.; Caron, L.F.; Santin, E. Effect of sanguinarine in drinking water on *Salmonella* control and the expression of immune cells in peripheral blood and intestinal mucosa of broilers. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 22, n. 3, p. 430-438, 2013.

Pickler, L.; Hayashi, R.M.; Lourenço, M.C.; Miglino, L.B.; Caron, L.F.; Beirão, B.C.B.; Silva, A.V.F.; Santin, E. Avaliação microbiológica, histológica e imunológica de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis e Minnesota e tratados com ácidos orgânicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. p. 27-36, 2012.

Rabsch, W.; Hargis, B.M.; Tsois, R.M.; Kingsley, R.A.; Hinz, K.H.; Tschape, H.; Baumler, A.J. Competitive exclusion of *Salmonella* Enteritidis by *Salmonella* Gallinarum in poultry. **Emerging Infectious Disease**, v. 6, n. 5, p. 443-448, 2000.

Raetz, C.R.H.; Whitfield, C. Lipopolysaccharide endotoxins, **Annual Review of Biochemistry**, p. 2002.

Rettger, L.F.; Harvey, S.C. Fatal septicemia in young chickens, or "white diarrhea", **The Journal of Medical Research**, p. 1980.

Roberts, T.; Wilson, J.; Guthrie, A.; Cookson, K.; Vancraeynest, D.; Schaeffer, J.; Moody, R.; Clark, S. New issues and science in broiler chicken intestinal health: Emerging technology and alternative interventions. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 24, n. 2, p. 257-266, 2015.

Russell, J.B. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. **Journal of Applied Microbiology**, v. 73, n. 5, p. 363-370, 1992.

Santana, E.S.; Andrade, M.A.; Café, M.B.; Stringhini, J.H.; Rocha, T.M.; Jaime, V.S. Efeitos da lactulose na saúde gastrointestinal de frangos de corte experimentalmente inoculados com *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium. **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, n. p. 187-194, 2014.

Sasai, K.; Aita, M.; Lillehoj, H.S.; Miyamoto, T.; Fukata, T.; Baba, E. Dynamics of lymphocyte subpopulation changes in the cecal tonsils of chickens infected with *Salmonella* Enteritidis. **Veterinary Microbiology**, v. 74, n. 4, p. 345-351, 2000.

Scallan, E.; Hoekstra, R.M.; Angulo, F.J.; Tauxe, R.V.; Widdowson, M.A.; Roy, S.L.; Jones, J.L.; Griffin, P.M. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. **Emerging Infectious Disease**, v. 17, n. 1, p. 7-15, 2011.

Schlumberger, M.C.; Hardt, W.D. *Salmonella* type III secretion effectors: pulling the host cell's strings. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 46-54, 2006.

Shiloh, M.U.; Macmicking, J.D.; Nicholson, S.; Brause, J.E.; Potter, S.; Marino, M.; Fang, F.; Dinauer, M.; Nathan, C. Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. **Immunity**, v. 10, n. 1, p. 29-38, 1999.

Shippy, D.C.; Eakley, N.M.; Mikheil, D.M.; Fadl, A.A. Role of StdA in adhesion of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis phage type 8 to host intestinal epithelial cells. **Gut Pathogens**, v. 5, n. p. 43-43, 2013.

Silva, E.N. Duarte, A. *Salmonella* Enteritidis em Aves: Retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 4, n. p. 85-100, 2002.

Singh, R.; Shushni, M.a.M. Belkheir, A. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 8, n. 3, p. 322-328, 2015.

Songhet, P.; Barthel, M.; Stecher, B.; Muller, A.J.; Kremer, M.; Hansson, G.C.; Hardt, W.D. Stromal IFN-gammaR-signaling modulates goblet cell function during *Salmonella* Typhimurium infection. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. 28, 2011.

Stecher, B.; Hapfelmeier, S.; Müller, C.; Kremer, M.; Stallmach, T.; Hardt, W.D. Flagella and chemotaxis are required for efficient induction of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 7, p. 4138-4150, 2004.

Steeb, B.; Claudi, B.; Burton, N.A.; Tienz, P.; Schmidt, A.; Farhan, H.; Mazé, A.; Bumann, D. Parallel exploitation of diverse host nutrients enhances *Salmonella* virulence. **PLoS Pathology**, v. 9, n. 4, p. 1-16, 2013.

Stratford, M.; Plumridge, A.; Nebe-Von-Caron, G.; Archer, D.B. Inhibition of spoilage mould conidia by acetic acid and sorbic acid involves different modes of action, requiring modification of the classical weak-acid theory. **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, n. 1, p. 37-43, 2009.

Swayne, D.E.; Glisson, J.R.; McDougald, L.R.; Nolan, L.K.; Suarez, D.L.; Nair, V.L. Diseases of Poultry, **Wiley**, 2013.

Umezawa, K.; Akaike, T.; Fujii, S.; Suga, M.; Setoguchi, K.; Ozawa, A.; Maeda, H. Induction of nitric oxide synthesis and xanthine oxidase and their roles in the antimicrobial mechanism against *Salmonella* Typhimurium infection in mice. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 7, p. 2932-2940, 1997.

US Food and Drug Administration: Guidance for Industry 209: The Judicious Use of Medically Important Antimicrobial Drugs in Food-Producing Animals. 2012. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/UCM216936.pdf>. Acesso em 06 de março de 2016.

Van Asten, F.J.; Hendriks, H.G.; Koninkx, J.F.; Van Dijk, J.E. Flagella-mediated bacterial motility accelerates but is not required for *Salmonella* serotype Enteritidis invasion of differentiated Caco-2 cells. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 294, n. 6, p. 395-399, 2004.

Van Der Velden, A.W.M.; Bäumlér, A.J.; Tsois, R.M.; Heffron, F. Multiple fimbrial adhesins are required for full virulence of *Salmonella* Typhimurium in mice. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 6, p. 2803-2808, 1998.

Van Immerseel, F.; De Buck, J.; De Smet, I.; Mast, J.; Haesebrouck, F.; Ducatelle, R. Dynamics of immune cell infiltration in the caecal lamina propria of chickens after neonatal infection with a *Salmonella* Enteritidis strain. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 26, n. 4, p. 355-364, 2002.

Vandeplas, S.; Dubois D., R.; Beckers, Y.; Thonart, P.; Thewis, A. *Salmonella* in chicken: current and developing strategies to reduce contamination at farm level. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 4, p. 774-785, 2010.

Vazquez-Torres, A.; Jones-Carson, J.; Mastroeni, P.; Ischiropoulos, H.; Fang, F.C. Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase

in experimental salmonellosis. I. Effects on microbial killing by activated peritoneal macrophages in vitro. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 2, p. 227-236, 2000.

Viola, E.S.; Vieira, S.L.; Torres, C.A.; Freitas, D.M.; Berres, J. Desempenho de frangos de corte sob suplementação com ácidos láctico, fórmico, acético e fosfórico no alimento ou na água. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 296-302, 2008.

Voss-Rech, D.; Vaz, C.S.L.; Alves, L.; Coldebella, A.; Leão, J.A.; Rodrigues, D.P.; Back, A. A temporal study of *Salmonella enterica* serotypes from broiler farms in Brazil. **Poultry Science**, v.94, n. 3, p. 433-441, 2015.

Wallis, T.S.; Galyov, E.E. Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. **Molecular Microbiology**, v. 36, n. 5, p. 997-1005, 2000.

Wigley, P.; Kaiser, P. Avian cytokines in health and disease. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 5, n. p. 1-14, 2003.

Winter, S.E.; Thiennimitr, P.; Winter, M.G.; Butler, B.P.; Huseby, D.L.; Crawford, R.W.; Russell, J.M.; Bevins, C.L.; Adams, L.G.; Tsolis, R.M.; Roth, J.R.; Bäuml, A.J. Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. **Nature**, v. 467, n. 7314, p. 426-429, 2010.

Withanage, G.S.; Wigley, P.; Kaiser, P.; Mastroeni, P.; Brooks, H.; Powers, C.; Beal, R.; Barrow, P.; Maskell, D.; McConnell, I. Cytokine and chemokine responses associated with clearance of a primary *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in the chicken and in protective immunity to rechallenge. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 8, p. 5173-5182, 2005.

Withanage, G.S.K.; Kaiser, P.; Wigley, P.; Powers, C.; Mastroeni, P.; Brooks, H.; Barrow, P.; Smith, A.; Maskell, D.; McConnell, I. Rapid expression of chemokines and proinflammatory cytokines in newly hatched chickens infected with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 4, p. 2152-2159, 2004.

Wood, M.W.; Jones, M.A.; Watson, P.R.; Siber, A.M.; McCormick, B.A.; Hedges, S.; Rosqvist, R.; Wallis, T.S.; Galyov, E.E. The secreted effector protein of *Salmonella* Dublin, SopA, is translocated into eukaryotic cells and influences the induction of enteritis. **Cell Microbiology**, v. 2, n. 4, p. 293-303, 2000.

Wooldridge, K.G.; Williams, P.H. Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 325-348, 1993.

Zaki, H.M.B.A.; Mohamed, H.M.H.; El-Sherif, A.M.A. Improving the antimicrobial efficacy of organic acids against *Salmonella enterica* attached to chicken skin using SDS with acceptable sensory quality. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 558-564, 2015.

Zhang, Z.F.; Kim, I.H. Effects of multistrain probiotics on growth performance, apparent ileal nutrient digestibility, blood characteristics, cecal microbial shedding, and excreta odor contents in broilers. **Poultry Science**, v. 93, n. 2, p. 364-370, 2014.

**CAPÍTULO 3 - EFEITO DA SANGUINARINA NA ÁGUA DE BEBIDA NO
CONTROLE DA *SALMONELLA* E EXPRESSÃO DE CÉLULAS IMUNOLÓGICAS
NO SANGUE PERIFÉRICO E MUCOSA INTESTINAL DE FRANGOS**

Artigo publicado na revista Journal of Applied Poultry Research, n. 22, 430-338, 2013.

(Anexo 1).

3 EFEITO DA SANGUINARINA NA ÁGUA DE BEBIDA NO CONTROLE DA *SALMONELLA* E EXPRESSÃO DE CÉLULAS IMUNOLÓGICAS NO SANGUE PERIFÉRICO E MUCOSA INTESTINAL DE FRANGOS

Effect of sanguinarine in drinking water on Salmonella control and the expression of immune cells in peripheral blood and intestinal mucosa of broilers

3.1 RESUMO

O papel do trato gastrointestinal em reconhecer e eliminar microrganismos patogênicos por meio da inflamação é crítico para o estabelecimento da saúde. Sanguinarina é um sal de amônio quaternário que pertence ao grupo dos alcaloides de benzofenantridina e protopina. O presente estudo foi conduzido para avaliar o efeito da sanguinarina via água de bebida na redução da contagem de *Salmonella* Enteritidis (SE) e alterações na morfologia intestinal e expressão de células imunológicas no sangue periférico e na mucosa intestinal de frangos desafiados com SE. Frangos de corte desafiados com SE que receberam sanguinarina na água de bebida apresentaram redução no isolamento de SE no ceco e no papo aos 7 dias após inoculação quando comparado ao grupo controle. Frangos tratados com sanguinarina via água de bebida apresentaram redução na expressão de células caliciformes e CD3⁺ no duodeno e jejuno e maior expressão de células CD4, CD8 α , CD8 α^{bright} , CD8 α^{dim} , CD8 β , TCR V β 1, e CD28 no sangue quando comparados ao grupo não tratado. Também foi avaliado MHC I, MHC II e TCR $\alpha\beta$ V β 2, porém não foram encontradas diferenças entre os tratamentos.

Palavras-chave: sanguinarina, citometria de fluxo, sistema imunológico, alcaloide de protopina, *Salmonella* Enteritidis.

3.2 ABSTRACT

The role of the gastrointestinal tract in recognising and eliminating pathogenic microorganisms through inflammation is critical for the establishment of health. Sanguinarine is a quaternary ammonium salt that belongs to a group of benzophenanthridine and protopin alkaloids. The present study was conducted to evaluate the effects of using sanguinarine in the drinking water of broilers on reducing the *Salmonella* Enteritidis (SE) count and to assess changes in intestinal morphology and the expression of immune cells in the peripheral blood and intestinal mucosa of broilers challenged with SE. The treatment of SE-challenged broilers with sanguinarine via drinking water reduced SE isolation in the cecum and in the crop at 7 days post-inoculation (dpi) when compared to the control group. Broilers treated with sanguinarine via drinking water presented a significantly lower expression of goblet and CD3⁺ cells in the duodenum and jejunum and higher expression of cells positive for the markers CD4, CD8 α , CD8 α^{bright} , CD8 α^{dim} , CD8 β , TCR V β 1, and CD28 in the blood compared to the non-treated birds. We also evaluated MHC I, MHC II and TCR $\alpha\beta$ V β 2, but there were no differences between treatments.

Key-words: sanguinarine, flow cytometry, immune system, protopin alkaloids, *Salmonella* Enteritidis.

3.3 DESCRIÇÃO DO PROBLEMA

A saúde do trato gastrointestinal (TGI) é essencial para a ótima produção e desempenho animal, pois os nutrientes requeridos pelos diversos sistemas orgânicos são digeridos e absorvidos pelo TGI.

O TGI possui uma extensa área exposta aos patógenos como, por exemplo, a *Salmonella*, e assim predisposto à inflamação. A tentativa de reconhecer e eliminar os microrganismos patogênicos através da inflamação é um processo crítico para o estabelecimento da saúde do TGI (Rescigno *et al.*, 2008). Entretanto, o processo inflamatório pode comprometer o desenvolvimento adequado do animal, pois este requer recursos orgânicos, direcionando os nutrientes para a resposta imunológica (Klasing e Korver, 1997). A inflamação da mucosa intestinal compromete a capacidade de absorção de nutrientes, pois aumenta a quantidade de células inflamatórias. O equilíbrio da microbiota intestinal é também importante quando se considera a inflamação da mucosa intestinal, pois inicialmente todo microrganismo ocasiona uma resposta inflamatória e microrganismos benéficos modulam esta resposta através do desenvolvimento da imunotolerância, minimizando os efeitos da inflamação na mucosa intestinal (Everett *et al.*, 2004; Rescigno *et al.*, 2008; Umesaki e Setoyama, 2000).

O equilíbrio da microbiota intestinal foi mantido por muito tempo em frangos pelo uso de antibióticos como promotores de crescimento. Devido às restrições legais no uso de antibióticos em rações para animais, outros mecanismos de controle da microbiota intestinal e inflamação são necessários. Uma alternativa aos antibióticos promotores de crescimento que podemos citar é o uso de aditivos fitogênicos, como os alcaloides de sanguinarina. A sanguinarina é um sal de amônio quaternário derivados dos alcaloides de benzofenantridina e protopina, podendo ser obtido de plantas como a *Sanguinaria canadenses* e a *Argemone mexicana* (Hu *et al.*, 2001; Mahady e Beecher, 1994; Vavreckova *et al.*, 1996). Alguns estudos indicam que a sanguinarina inibe o crescimento bacteriano por afetar a replicação dos microrganismos (Schmeller *et al.*, 1997). Entretanto, o efeito antiinflamatório da sanguinarina está ainda sob investigação. Recentemente foi demonstrado propriedades anti-carcinogênicas e antiinflamatórias em animais, demonstrando que o aditivo pode afetar a degranulação e a fagocitose de neutrófilos *in vitro* (Ahmad *et al.*, 2000; Slaninová *et al.*, 2001).

Parâmetros como os linfócitos na mucosa intestinal e CD4, CD8 α , CD8 α^{bright} , CD8 α^{dim} , CD8 β , TCR V β 1 e CD28 no sangue mostraram-se valiosos na compreensão do entendimento da dinâmica imunológica durante a infecção por *Salmonella* (Beirao *et al.*,

2012). O desafio dos animais com diferentes microrganismos é capaz de alterar o desenvolvimento de fenótipos específicos das células imunológicas (Li *et al.*, 2000).

Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da sanguinarina na água de bebida na contagem de *Salmonella* Enteritidis (SE), na morfologia intestinal e na expressão de células imunológicas no sangue periférico e na mucosa intestinal de frangos desafiados com SE.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos utilizados neste experimento foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Paraná.

Aves, desenho experimental, dieta e alojamento

Foram utilizados 120 frangos de corte de um dia de idade da linhagem Cobb 500, divididos em dois tratamentos com quatro replicações com 15 aves cada. O tratamento 1 (T1) era o grupo controle, sem produtos adicionado a água de bebida e no tratamento 2 (T2) as aves receberam sanguinarina na água de bebida na dosagem 100 g/1000 L 24 h após o desafio com SE, durante seis dias.

No primeiro dia do experimento, cinco aves foram eutanasiadas e necropsiadas para coleta de fígado e ceco para avaliação da negatividade dos animais para *Salmonella*. Antes do início do experimento, o ambiente foi limpo e desinfetado e também foi realizada análise de *Salmonella* para certificação de que o ambiente estava livre do agente.

As aves foram mantidas no mesmo ambiente, distribuídas em 8 gaiolas com 15 aves cada. As aves foram mantidas em temperatura de conforto de acordo com a idade, sendo na primeira semana $27,5 \pm 0,72^{\circ}$ C; na segunda semana $24,6 \pm 0,83^{\circ}$ C e na terceira semana $20,5 \pm 0,95^{\circ}$ C, de acordo com o manual da linhagem. As aves receberam água e alimento à vontade e a dieta era balanceada com níveis iguais ou superiores aos recomendados pelo NRC (NRC, 1994).

Produto

Sangrovit® - Phytobiotics, Futterzusatzstoffe GmbH, Eltville, Alemanha (GmbH) é um produto comercial composto por 1,5% de sanguinarina, um alcalóide quaternário de benzofenantridina e protopina extraído de plantas. A dose utilizada neste estudo seguiu as recomendações dos fabricantes.

Desafio

O inóculo de SE foi preparado com bactéria isolada de frangos de corte. Os isolados foram incubados em caldo cérebro-coração por 24 h, 37° C. A suspensão foi diluída na concentração 0,5 da escala de McFarland, que corresponde a concentração de 10^8 UFC/mL de SE. Diluições seriadas foram realizadas até que a concentração de 10^5 UFC/mL fosse atingida.

Aos 14 dias de idade, todas as aves foram desafiadas com 1 mL da suspensão de SE na concentração de 10^5 UFC/mL.

As aves do grupo T2, iniciaram o tratamento com sanguinarina na água de bebida 24 h após inoculação, pelo período de 6 dias. A água era trocada a cada 12 h para manter a estabilidade do produto. Análises laboratoriais mostraram que o produto permanece estável por até 7 dias.

Necropsia e isolamento bacteriano

Foi realizada coleta de *swab* de cloaca 48 h após desafio de todas as aves e posterior análise de contagem de *Salmonella*. Aos 21 dias de idade, 3 aves por replicação (12 por tratamento) foram eutanasiados e necropsiados e papo e ceco foram coletados de forma asséptica para análise de *Salmonella*. Amostras de 5 cm de duodeno, jejuno, íleo e ceco foram coletadas em solução de formalina 10% e submetidas a processamento histológico e coloração de Alcian Blue para avaliação de células caliciformes e imunistoquímica para avaliação de linfócitos CD3+.

A análise de *Salmonella* nos *swabs*, papo e ceco foi realizada de acordo com previamente descrito por Pickler *et al.* 2012. As amostras foram homogeneizadas em água peptonada tamponada 2% na concentração de 1:10. Diluições seriadas foram realizadas posteriormente em tubos com 9 mL de água peptonada tamponada 0,1% até a diluição 10^{-3} . Alíquotas de 100 µL de cada diluição foram transferidas para placas de XLD (Xilose Lisina Desoxicolato) em duplicada e o líquido foi espalhado nas placas com alça de Drigalsky. As placas foram incubadas a 35° C por 24 h e após este período as colônias típicas de *Salmonella* foram contadas. A água peptonada tamponada inicial também foi incubada a 35° C por 24 h. Caso não houvesse crescimento, o enriquecimento das amostras era realizado com caldo Rappaport-Vassiliadis, onde 100 µL da solução inicial de água peptonada tamponada era transferida para o caldo seletivo e incubado a 42° C por 24 h. Para confirmação do sorovar, as colônias isoladas nas placas de XLD foram enviadas ao setor de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz, Brasil.

Avaliação do desempenho zootécnico

No primeiro e aos 21 dias de idade a quantidade de ração consumida foi pesada para determinação do ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar. A conversão alimentar foi calculada dividindo o consumo de ração pelo ganho de peso.

Histopatologia e Imunoistoquímica

Para avaliação da morfologia intestinal, amostras de duodeno, jejuno, íleo e ceco foram processadas rotineiramente para histopatologia e coradas com Alcian Blue de acordo com previamente descrito (Smirnov *et al.*, 2004). Parâmetros como altura de vilosidade, profundidade de cripta, relação vilo/cripta e contagem de células caliciformes por campo foram avaliados. As análises morfométricas do epitélio intestinal foram realizadas em microscópio óptico acoplado a um sistema de captura de imagens. Amostras de duodeno, jejuno, íleo e ceco também foram analisados por imunoistoquímica para avaliação de células CD3+ (Pickler *et al.*, 2012).

Citometria de fluxo

Sangue foi coletado de quatro aves por tratamento (uma por replicação) aos 21 dias de idade em tubos com heparina para avaliação das células imunológicas circulantes no sangue periférico (Beirao *et al.*, 2012).

Análise estatística

Os resultados do desempenho zootécnico (consumo de ração, ganho de peso e conversão alimentar), contagem de *Salmonella* e morfometria intestinal foram submetidos ao teste T. A contagem de *Salmonella* foi transformada em Log10 e as amostras negativas e positivas para *Salmonella* foram analisadas pelo teste do chi-quadrado.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta a contagem de *Salmonella* em *swabs* de cloaca 48 hpi (horas pós inoculação) e os resultados das amostras positivas e negativa em papo e ceco aos 7 dpi (dias pós inoculação). Aos 7 dpi não foi possível realizar contagem de *Salmonella* e a análise qualitativa foi realizada (presença ou ausência) após o enriquecimento seletivo, como descrito previamente. Os resultados indicam que apesar de a sanguinarina não reduzir a contagem de *Salmonella* em *swabs* de cloaca, houve uma redução significativa no papo e ceco aos 7 dias

após inoculação. O efeito antibacteriano da sanguinarina já foi previamente reportado em muitos estudos *in vivo* e *in vitro* (Herrera-Mata e Rosas-Romero 2002; Mahady *et al.*, 2003; Walker, 1990). O uso e soluções bucais com sanguinarina reduziu gengivite em pessoas, demonstrando as propriedades antimicrobiana e antiinflamatórias deste composto (Gonzalez *et al.*, 2001).

O uso da sanguinarina na concentração de 30 mg/kg na dieta de aves foi descrito como redutor do pH digestivo, redutor da atividade da β -glucuronidase e por aumentar a concentração de ácido butírico. (Zdunczyk *et al.*, 2010). O ácido butírico é especificamente formulado para resistir à passagem no trato gastrointestinal superior de aves e reduzir a *Salmonella* no ceco de aves. (Van-Immerseel *et al.*, 2005; Vandeplass *et al.*, 2010) e este pode ser a explicação para o efeito da sanguinarina na redução de *Salmonella* neste estudo.

Tabela 1 - Contagem de *Salmonella* Enteritidis (SE) em swabs de cloaca 48 hpi (horas pós inoculação) e número de amostras positivas e negativas no papo e ceco aos 7 dpi (dias pós inoculação)

Tratamento	Swab de cloaca 48 hpi Log10 UFC/g (Amostras positivas/negativas)	Amostras positivas/negativas no ceco 7 dpi	Amostras positivas/negativas no papo 7 dpi
Controle	2.85±0.46** (10/2)	11/1 ^a	10/2 ^a
Sanguinarina	2.39±0.35 (11/1)	0/12 ^b	5/7 ^b
Valor de P	P>0.05 t-test	P<0.05 X ² test	P<0.05 X ² test

^{a, b} Média ± erro padrão com diferentes letras na mesma coluna são diferentes $P \leq 0.05$

** Média e erro padrão da contagem de *Salmonella* Enteritidis (Log10 UFC/g) (n=12/tratamento).

A Tabela 2 apresenta os resultados da morfometria intestinal. As vilosidades foram significativamente maiores em todos os segmentos intestinais de aves do grupo controle quando comparadas ao grupo que recebeu sanguinarina.

No jejuno e no íleo, aves do grupo controle apresentaram profundidade de cripta significativamente maior que aqueles que receberam sanguinarina, os quais a relação vilo/cripta foi maior que o íleo e menor no ceco quando comparado com o grupo controle. Prévios estudos reportaram que a adição de sanguinarina na dieta de frangos de corte reduziu significativamente a altura de vilosidade e a espessura da camada glandular (Jankowski *et al.*,

2009). Discordando destes resultados Vieira *et al.*, 2008, não observaram diferenças na altura de vilosidade e profundidade de cripta em aves que receberam sanguinarina na dieta.

Tabela 2 – Parâmetros histológicos e imunológicos no duodeno, jejuno, íleo e ceco de aves aos 21 dias de idade recebendo ou não sanguinarina na água de bebida (n=20/tratamento)

Fragmento	Característica	Controle	Sanguinarina
Duodeno	Altura de vilo*	1,284,4±52,37 ^a	1,083,3±34,52 ^b
	Profundidade de cripta*	83,3±3,80	75,6±7,00
	Vilo/Cripta*	16,0±0,94	16,4±1,34
	Caliciformes/vilo	171,2±2,57 ^a	125,9±3,70 ^b
	CD3 ⁺ /vilo	138,1±5,28 ^a	57,0±3,67 ^b
Jejuno	Altura de vilo*	1,288,1±42,22 ^a	1,149,1±31,50 ^b
	Profundidade de cripta*	145,3±4,00 ^a	119,8±5,40 ^b
	Vilo/Cripta*	9,0±0,40	10,0±0,58
	Caliciformes/vilo	148,0±2,60 ^a	110,5±1,16 ^b
	CD3 ⁺ /vilo	131,0±1,36 ^a	73,6±4,40 ^b
Íleo	Altura de vilo*	663,8±21,98	615,2±22,72
	Profundidade de cripta*	121,5±7,02 ^a	82,4±4,54 ^b
	Vilo/Cripta*	5,9±0,45 ^a	7,9±0,51 ^b
	Caliciformes/vilo	138,2±2,52	120,6±4,37
	CD3 ⁺ /vilo	125,2±3,00 ^a	68,3±1,55 ^b
Ceco	Altura de vilo*	243,4±13,26 ^a	189,5±12,00 ^b
	Profundidade de cripta*	124,8±9,21	138,3±8,72
	Vilo/Cripta*	2,2±0,24 ^a	1,5±0,13 ^b
	Caliciformes/vilo	6,0±0,36	6,7±0,25
	CD3 ⁺ /vilo	24,0±1,30	15,1±0,35

^{a, b} Média ± erro padrão com diferentes letras sobrescritas são diferentes para P≤0.05

* µm

Diversos estudos correlacionam que quanto maior a altura de vilosidade intestinal, maior a superfície de absorção de nutrientes e consequentemente melhor o desempenho zootécnico (Santin *et al.*, 2001). No entanto, mesmo sendo observado que quanto maior a altura de vilo, melhor a absorção de nutrientes em condições experimentais sem desafios, já foi observado que em experimentos com aves desafiadas o tipo de células encontradas, como

enterócitos e células inflamatórias nas vilosidades, são tão importantes quanto a altura da vilosidade. Uma grande quantidade de células caliciformes e células imunológicas, como CD3+, geralmente não estão correlacionadas com melhor absorção, pois elas reduzem a capacidade de absorção, aumentando a viscosidade intestinal e a taxa de passagem de alimento.

No presente estudo foi observado aumento significativo no número de células CD3+ no duodeno, jejuno e íleo e maior quantidade de células caliciformes foi observado no duodeno e no íleo das aves do grupo controle não tratado com sanguinarina (Figuras 1 e 2). As células caliciformes secretam glicoproteínas (muco), que é responsável pela proteção da mucosa intestinal frente à ação das enzimas digestivas e efeitos abrasivos dos componentes da dieta.

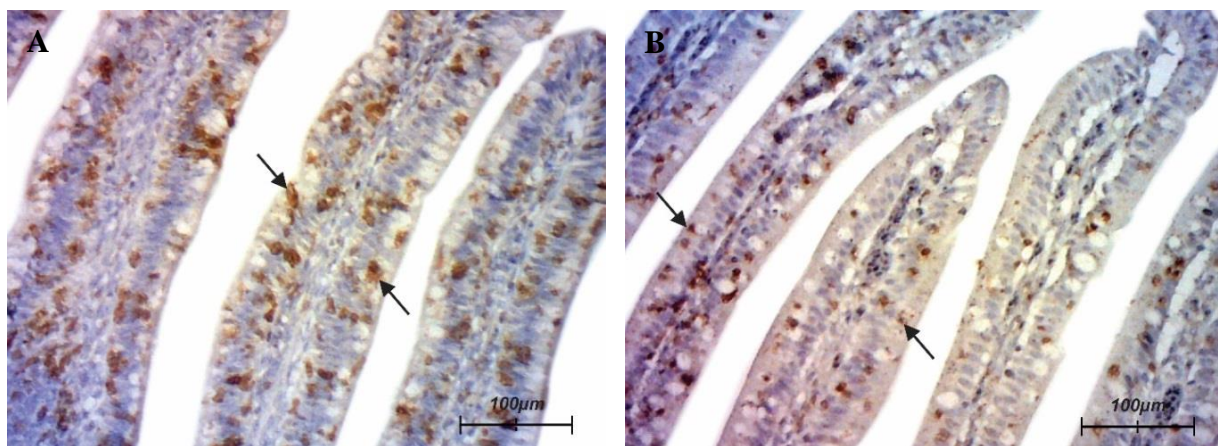


Figura 1 - Expressão de células CD3+ (imunoistoquímica) no jejuno aos 21 dias de idade de aves desafiadas com *Salmonella* Enteritidis não tratadas (A) ou tratadas com sanguinarina (B). Setas indicam células CD3+.

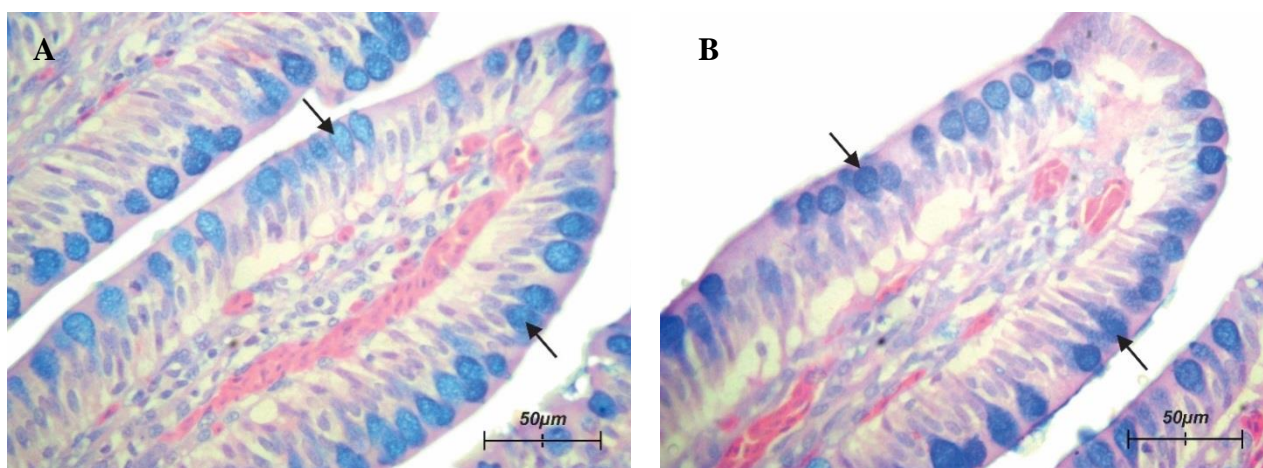


Figura 2 - Expressão de células caliciformes (Alcian Blue) no jejuno aos 21 dias de idade de aves desafiadas com *Salmonella* Enteritidis e não tratadas (A) ou tratadas com sanguinarina (B). Setas indicam células caliciformes.

A citometria de fluxo foi utilizada neste estudo para avaliar a porcentagem de diferentes subpopulações de linfócitos circulantes. Foram observadas diferenças significativas entre tratamentos para as subpopulações celulares de CD4, CD8 α , CD8 α^{bright} , CD8 α^{dim} , CD8 β , TCR $\alpha\beta$ V β 1 e CD28 onde foi observado maior porcentagem ($P < 0,05$) no sangue das aves tratadas com sanguinarina quando comparadas ao grupo controle (Tabela 3). Os dados disponíveis na literatura indicam que aves infectadas com *Salmonella* apresentam redução na proporção e na contagem absoluta de células CD8 α , CD4+CD8+ e TCRV β 2+ e redução na contagem absoluta de CD8+TCRV β 1+ e MHC II $^{\text{bright+}}$, sugerindo que a migração celular é parte da resposta imunológica adaptativa e da reação à infecção (Beirao *et al.*, 2012).

Tabela 3 – Porcentagens de subpopulações celulares identificadas no sangue periférico. (n=4/tratamento)

Molécula de superfície	Controle	Sanguinarina
CD4	15,17 \pm 1,84 ^b	48,00 \pm 14,88 ^a
CD8 α	7,11 \pm 0,09 ^b	30,81 \pm 1,04 ^a
CD8 α^{Bright}	0,33 \pm 0,10 ^b	3,00 \pm 0,54 ^a
CD8 α^{Dim}	6,78 \pm 1,00 ^b	27,80 \pm 0,43 ^a
CD4:CD8 α	2,24 \pm 0,40	1,56 \pm 0,28
CD8 β	2,66 \pm 0,36 ^b	6,23 \pm 1,52 ^a
MHC I	1,14 \pm 0,30	0,48 \pm 0,20
MHC II	11,78 \pm 2,50	11,36 \pm 3,41
MHC II ^{Bright}	0,99 \pm 0,21	2,08 \pm 0,68
TCR $\alpha\beta$ V β 1	8,25 \pm 1,72 ^b	38,57 \pm 12,65 ^a
TCR $\alpha\beta$ V β 2	4,60 \pm 0,63	11,12 \pm 3,55
CD28	17,48 \pm 4,50 ^b	62,39 \pm 19,00 ^a

^{a, b} Média \pm erro padrão com diferentes letras sobrescritas na mesma coluna são diferentes para $P \leq 0,05$.

No presente estudo, os resultados estão de acordo com previamente descrito (Beirao *et al.*, 2012), onde aves infectadas apresentaram baixas proporções de linfócitos T auxiliares (CD4+) quando comparados com aves infectadas e tratadas com sanguinarina. As porcentagens de células CD8+ seguiram o mesmo padrão, encontrando-se reduzidas nas aves não tratadas em comparação com as tratadas com sanguinarina, incluindo as células CD8 $\alpha^{\text{bright+}}$

e CD8 β que são citotóxicas assim como células CD8 $\alpha^{\text{dim}+}$ que estão associadas com células duplo-positivas (CD4 $^{+}$ CD8 $^{+}$). Em adição, foi observado aumento na presença de células CD3 $^{+}$ na mucosa intestinal que foi inversamente proporcional à quantidade de linfócitos circulantes no sangue periférico em aves não tratadas.

O aumento de células CD4 $^{+}$ parece estar correlacionado com a imunocompetência de largo espectro, com tendência a resposta imunológica humoral, enquanto o aumento de células CD8 $^{+}$ está associado a atividade citotóxica contra patógenos intracelulares (Parmentier *et al.*, 1995). De fato, aves com alta produção de anticorpos possuem maior proporções de células CD4 $^{+}$ (Davidson *et al.*, 1992). Grandes diferenças na razão CD4:CD8 (valores maiores que 2) indicam mudanças na resposta imunológica. No presente estudo a razão entre células T auxiliares e citotóxicas se apresentou constante entre os grupos, pois a quantidade de células CD4 $^{+}$ foi concomitantemente reduzindo com as células CD8 $^{+}$.

Aves apresentam três diferentes receptores de células T (TCR) incluindo o TCR $\gamma\delta$ (TCR1), TCR $\alpha\beta$ V β 1 (TCR2), e TCR $\alpha\beta$ V β 2. No presente estudo, os dois últimos marcadores foram utilizados. Cada célula individual expressa somente um tipo de TCR na sua superfície, e os três tipos podem estar presentes nas células CD4 $^{+}$ e CD8 $^{+}$ (Sowder *et al.*, 1988; Zekarias *et al.*, 2002). Acredita-se que o TCR2 esteja envolvido com a imunidade de mucosa, pois ele estimula a produção de IgA (Parmentier *et al.*, 1995; Van-Immerseel *et al.*, 2002). O forte estímulo da inoculação por SE pode ter desencadeado a liberação de células TCR2 do sangue nas aves controle, pois o número de linfócitos TCR2 circulantes foi maior nas aves tratadas com sanguinarina do que nas aves controle. Durante a progressão da infecção, entre os dias 2 e 21 pós infecção, ocorre a infiltração de linfócitos T de ambos os fenótipos no tecido afetado, podendo ocupar cerca de 12% da lâmina própria durante a infecção (Barua e Yoshimura 2004; Zekarias *et al.*, 2002). De todas estas células T, a dominante no tecido linfoide é o TCRV β 1 (Holt *et al.*, 2010).

CD28 é o receptor envolvido na co-estimulação de células T quando estas células fazem contato com as células apresentadoras de antígenos (APCs). A interação entre CD28 e B7 é essencial no desenvolvimento da resposta imunológica (Papagno *et al.*, 2004).

A redução na porcentagem de células CD28 $^{+}$ circulantes é observada na fase aguda de processos infecciosos, pois estas células estão diretamente associadas com órgão linfoides secundários em um processo chamado de *homing*, ou devido a excessiva ativação celular e consequente senescência, quando o CD28 é perdido (Hala *et al.*, 1981). No presente estudo acredita-se que este processo possa ter ocorrido, pois aves não tratadas com sanguinarina apresentaram maior porcentagem de células ativadas nos órgãos linfoides primários e

secundários, devido à alta pressão de infecção que pode ter explicado as diferenças observadas entre os tratamentos.

O complexo de histocompatibilidade maior classe I (MHC-I), conhecido como antígeno F em aves, está presente em todos os linfócitos e eritrócitos de aves (Hunt *et al.*, 2001). O complexo de histocompatibilidade maior classe II (MHC-II) ou antígeno L está presente na maioria dos linfócitos bolsa dependentes em aves. Aproximadamente 10% dos linfócitos de aves são positivos para MHC-II, dos quais 90% são linfócitos B (Hunt *et al.*, 2001). Estas populações celulares foram semelhantes entre os tratamentos no presente estudo. Como regra geral, o receptor de MHC-I é responsável pela apresentação de antígenos intracelulares às células citotóxicas, enquanto o receptor MHC-II é responsável pela ativação dos linfócitos T auxiliares pela apresentação extracelular de antígenos. No entanto estes parâmetros não estão necessariamente correlacionados, pois muito da interação entre células ocorre fora do sistema circulatório, entre outras razões (Juul-Madsen *et al.*, 2004). Assim, no presente estudo não foi possível observar correlação entre os parâmetros das células sanguíneas. O tratamento não interferiu nas porcentagens das subpopulações MHC II^{bright+} e as células CD4⁺ aumentaram significativamente aos 21 dias de idade, como previamente discutido, mas no entanto não é possível correlacionar um evento com outro, devido as razões previamente descritas.

O tratamento com sanguinarina não influenciou o desempenho zootécnico do primeiro ao vigésimo primeiro dias de idade. Os dados disponíveis na literatura demonstram que aves tratadas com sanguinarina na dieta (30 g/t) não apresentaram melhoras no ganho de peso e conversão alimentar (Zdunczyk *et al.*, 2010). Em outro estudo, aves que receberam sanguinarina na concentração de 25 e 50 ppm apresentaram melhor ganho de peso e conversão alimentar aos 21 dias de idade (Vieira *et al.*, 2008). No presente estudo o foco principal não foi avaliar o desempenho zootécnico, mas o controle de *Salmonella*. Mais estudos serão necessários para compreender o efeito deste aditivo no desempenho zootécnico de aves.

3.6 CONCLUSÕES E APLICAÇÕES

Sob nossas condições de laboratório e desenho experimental, o tratamento de aves desafiadas com SE com sanguinarina na água de bebida reduziu o isolamento de SE no papo e ceco aos 7 dias pós inoculação quando comparado ao grupo controle.

Aves desafiadas com SE e tratadas com sanguinarina na água de bebida apresentaram menor altura de vilosidade e menor expressão de células caliciformes e células CD3⁺ na

mucosa intestinal e aumento na expressão de células positivas CD4, CD8 α , CD8 α^{bright} , CD8 α^{dim} , CD8 β , TCR V β 1 e CD28 no sangue quando comparado as aves não tratadas. A sanguinarina reduziu o desafio de mucosa, reduzindo o recrutamento de linfócitos no sítio de ação.

3.7 REFERÊNCIAS

Ahmad, N.; Gupta, S.; Husain, M.M.; Heiskanen, K.M.; Mukhtar, H. Differential antiproliferative and apoptotic response of sanguinarine for cancer cells versus normal cells. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 4, p. 1524-1528, 2000.

Almeida, J.A.; Ponnuraj, N.P.; Lee, J.J.; Utterback, P.; Gaskins, H.R.; Dilger, R.N.; Pettigrew, J.E. Effects of dietary clays on performance and intestinal mucus barrier of broiler chicks challenged with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and on goblet cell function in vitro. **Poultry Science**, v. 93, n. 4, p. 839-847, 2014.

Barua, A.; Yoshimura, Y. Ovarian cell-mediated immune response to *Salmonella* Enteritidis infection in laying hens (*Gallus domesticus*). **Poultry Science**, v. 83, n. 6, p. 997-1002, 2004.

Beirao, B.C.; Favaro, C., Jr.; Nakao, L.S.; Caron, L.F.; Zanata, S.M.; Mercadante, A.F. Flow cytometric immune profiling of specific-pathogen-free chickens before and after infectious challenges. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 145, n. 1-2, p. 32-41, 2012.

Davidson, N.J.; Chen, C.H.; Boyd, R.L. Kinetics of chicken embryonic thymocyte development in ovo and in organ culture. **European Journal of Immunology**, v. 22, n. 6, p. 1429-1435, 1992.

Everett, M.L.; Palestrant, D.; Miller, S.E.; Bollinger, R.R.; Parker, W. Immune exclusion and immune inclusion: a new model of host-bacterial interactions in the gut. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v. 4, n. 5, p. 321-332, 2004.

Fasina, Y.O.; Hoerr, F.J.; Mckee, S.R.; Conner, D.E. Influence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection on intestinal goblet cells and villous morphology in broiler chicks. **Avian Disease**, v. 54, n. 2, p. 841-847, 2010.

Gonzalez B., M.; Yslas, N.; Reyes, E.; Quiroz, V.; Santana, J.; Jimenez, G. Clinical effect of a mexican sanguinaria extract (*Polygonum aviculare* L.) on gingivitis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, n. 1, p. 45-51, 2001.

Hala, K.; Boyd, R.; Wick, G. Chicken major histocompatibility complex and disease. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 14, n. 6, p. 607-616, 1981.

Herrera-Mata, H. Rosas-Romero, A. Biological activity of “Sanguinaria” (*Justicia secunda*) extracts. **Pharmaceutical Biology**, v. 40, n. 3, p. 206-212, 2002.

Holt, P.S.; Vaughn, L.E.; Gast, R.K. Flow cytometric characterization of Peyer's patch and cecal tonsil T lymphocytes in laying hens following challenge with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 133, n. 2-4, p. 276-281, 2010.

Hu, C.M.; Cheng, H.W.; Cheng, Y.W.; Kan, J.J. Mechanisms underlying the induction of vasorelaxation in rat thoracic aorta by sanguinarine. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 85, n. 1, p. 47-53, 2001.

Hunt, H.D.; Lupiani, B.; Miller, M.M.; Gimeno, I.; Lee, L.F.; Parcells, M.S. Marek's disease virus down-regulates surface expression of MHC (B Complex) Class I (BF) glycoproteins during active but not latent infection of chicken cells. **Virology**, v. 282, n. 1, p. 198-205, 2001.

Jankowski, J.; Zdunczyk, Z.; Juskiewicz, J.; Kozłowski, K.; Lecewicz, A.; Jeroch, H. Gastrointestinal tract and metabolic response of broilers to diets with the *Macleaya cordata* alkaloid extract. **Archives of Geflügelk**, v. 73, n. 2, p. 95-101, 2009.

Juul-Madsen, H.R.; Su, G.; Sorensen, P. Influence of early or late start of first feeding on growth and immune phenotype of broilers. **British Poultry Science**, v. 45, n. 2, p. 210-222, 2004.

Kim, J.; Khan, W. Goblet cells and mucins: Role in innate defense in enteric infections. **Pathogens**, v. 2, n. 1, p. 55, 2013.

Klasing, K.C.; Korver, D.R. Leukocytic cytokines regulate growth rate and composition following activation of the immune system. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 2, p. 58-67, 1997.

Li, Z.; Nestor, K.E.; Saif, Y.M.; Luhtala, M. Flow cytometric analysis of T lymphocyte subpopulations in large-bodied turkey lines and a randombred control population. **Poultry Science**, v. 79, n. 2, p. 219-223, 2000.

Mahady, G.B.; Beecher, C.W. Quercetin-induced benzophenanthridine alkaloid production in suspension cell cultures of *Sanguinaria canadensis*. **Planta Medica**, v. 60, n. 6, p. 553-557, 1994.

Mahady, G.B.; Pendland, S.L.; Stoia, A.; Chadwick, L.R. In vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to isoquinoline alkaloids from *Sanguinaria canadensis* and *Hydrastis canadensis*. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 3, p. 217-221, 2003.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of poultry**, v. 9, 1994.

Papagno, L.; Spina, C.A.; Marchant, A.; Salio, M.; Rufer, N.; Little, S.; Dong, T.; Chesney, G.; Waters, A.; Easterbrook, P.; Dunbar, P.R.; Shepherd, D.; Cerundolo, V.; Emery, V.; Griffiths, P.; Conlon, C.; McMichael, A.J.; Richman, D.D.; Rowland-Jones, S.L.; Appay, V. Immune activation and CD8⁺ T-cell differentiation towards senescence in HIV-1 infection. **PLoS Biology**, v. 2, n. 2, p. 20, 2004.

Parmentier, H.K.; Kreukniet, M.B.; Goeree, B.; Davison, T.F.; Jeurissen, S.H.; Harmsen, E.G.; Nieuwland, M.G. Differences in distribution of lymphocyte antigens in chicken lines divergently selected for antibody responses to sheep red blood cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 48, n. 1-2, p. 155-168, 1995.

Pickler, L.; Hayashi, R.M.; Lourenço, M.C.; Miglino, L.B.; Caron, L.F.; Beirão, B.C.B.; Silva, A.V.F.; Santin, E. Avaliação microbiológica, histológica e imunológica de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis e Minnesota e tratados com ácidos orgânicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 27-36, 2012.

Rescigno, M.; Lopatin, U.; Chieppa, M. Interactions among dendritic cells, macrophages, and epithelial cells in the gut: implications for immune tolerance. **Current Opinion in Immunology**, v. 20, n. 6, p. 669-675, 2008.

Santin, E.; Maiorka, A.; Macari, M.; Grecco, M.; Sanchez, J.C.; Okada, T.M.; Myasaka, A.M. Performance and intestinal mucosa development of broiler chickens fed diets containing *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 10, n. 3, p. 236-244, 2001.

Schmeller, T.; Latz-Bruning, B.; Wink, M. Biochemical activities of berberine, palmatine and sanguinarine mediating chemical defence against microorganisms and herbivores. **Phytochemistry**, v. 44, n. 2, p. 257-266, 1997.

Slaninová, I.; Táborská, E.; Bochořáková, H.; Slanina, J. Interaction of benzo[c]phenanthridine and protoberberine alkaloids with animal and yeast cells. **Cell Biology and Toxicology**, v. 17, n. 1, p. 51-63, 2001.

Smirnov, A.; Sklan, D.; Uni, Z. Mucin dynamics in the chick small intestine are altered by starvation. **Journal of Nutrition**, v. 134, n. 4, p. 736-742, 2004.

Songhet, P.; Barthel, M.; Stecher, B.; Muller, A.J.; Kremer, M.; Hansson, G.C.; Hardt, W.D. Stromal IFN- γ -signaling modulates goblet cell function during *Salmonella* Typhimurium infection. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. 28, 2011.

Sowder, J.T.; Chen, C.L.; Ager, L.L.; Chan, M.M.; Cooper, M.D. A large subpopulation of avian T cells express a homologue of the mammalian T gamma/delta receptor. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 167, n. 2, p. 315-322, 1988.

Umesaki, Y.; Setoyama, H. Structure of the intestinal flora responsible for development of the gut immune system in a rodent model. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 11, p. 1343-1351, 2000.

Van-Immerseel, F.; Boyen, F.; Gantois, I.; Timbermont, L.; Bohez, L.; Pasmans, F.; Haesebrouck, F.; Ducatelle, R. Supplementation of coated butyric acid in the feed reduces colonization and shedding of *Salmonella* in poultry. **Poultry Science**, v. 84, n. 12, p. 1851-1856, 2005.

Van-Immerseel, F.; De-Buck, J.; De-Smet, I.; Mast, J.; Haesebrouck, F.; Ducatelle, R. Dynamics of immune cell infiltration in the caecal lamina propria of chickens after neonatal infection with a *Salmonella* Enteritidis strain. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 26, n. 4, p. 355-364, 2002.

Vandeplas, S.; Dubois D., R.; Beckers, Y.; Thonart, P.; Théwis, A. *Salmonella* in chicken: current and developing strategies to reduce contamination at farm level. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 4, p. 774-785, 2010.

Vavreckova, C.; Gawlik, I.; Muller, K. Benzophenanthridine alkaloids of *Chelidonium majus*; I. Inhibition of 5- and 12-lipoxygenase by a non-redox mechanism. **Planta Medica**, v. 62, n. 5, p. 397-401, 1996.

Vieira, S.L.; Oyarzabal, O.A.; Freitas, D.M.; Berres, J.; Peña, J.E.M.; Torres, C.A.; Coneglian, J.L.B. Performance of broilers fed diets supplemented with sanguinarine-like alkaloids and organic acids. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 17, n. 1, p. 128-133, 2008.

Walker, C. Effects of sanguinarine and sanguinaria extract on the microbiota associated with the oral cavity. **Journal of the Canadian Dental Association**, v. 56, n. 7, p. 13-30, 1990.

Zdunczyk, Z.; Gruzauskas, R.; Juskiewicz, J.; Semaskaite, A.; Jankowski, J.; Godycka-Klos, I.; Jarule, V.; Mieželiene, A.; Alencikienė, G. Growth performance, gastrointestinal tract responses, and meat characteristics of broiler chickens fed a diet containing the natural alkaloid sanguinarine from *Macleaya cordata*. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 19, n. 4, p. 393-400, 2010.

Zekarias, B.; Ter Huurne, A.A.; Landman, W.J.; Rebel, J.M.; Pol, J.M.; Gruys, E. Immunological basis of differences in disease resistance in the chicken. **Veterinary Research**, v. 33, n. 2, p. 109-125, 2002.

**CAPÍTULO 4 - RESPOSTA IMUNOLÓGICA E USO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS EM
FRANGOS DESAFIADOS COM *SALMONELLA* MINNESOTA.**

4 RESPOSTA IMUNOLÓGICA E USO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS EM FRANGOS DESAFIADOS COM *SALMONELLA* MINNESOTA.

Immune response and use of organic acids in broilers challenged with Salmonella Minnesota.

4.1 RESUMO

O controle da *Salmonella* na indústria avícola é de suma importância para evitar toxinfecções alimentares em seres humanos. O intenso controle da *Salmonella* Enteritidis ocasionou o maior isolamento de outros sorotipos como *Salmonella* Minnesota (SM), e não se pode afirmar que os aditivos utilizados no controle de *Salmonella* Enteritidis apresentam a mesma eficácia para o controle de outros sorovares. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a patogenia da SM em frangos desafiados e o uso de diferentes combinações de ácidos orgânicos para o controle de SM em frangos de corte. No presente estudo foram conduzidos três experimentos: um estudo *in vivo* para avaliar a patogenia da SM em frangos de corte onde as aves foram divididas em 4 tratamentos com 15 animais cada sendo T1 - animais inoculados via oral com SM, T2 – animais inoculados via ração com SM, T3 – aves contato com aves desafiadas com SM e T4 – controle negativo. Às 12, 24 e 48 horas após o desafio foi coletado papo, duodeno, ceco e fígado para detecção de SM e fragmentos de jejuno, íleo e ceco para análise de histopatologia e imunoistoquímica. Na avaliação microbiológica, 12 h após inoculação já foi possível observar a presença da SM no papo, duodeno e ceco de aves desafiadas via oral e via ração. Nas aves contato, 24 h após contato com as aves desafiadas, já foi possível observar presença da SM no papo e duodeno. Foi observado aumento significativo de células caliciformes em jejuno, 24 h após inoculação nas aves inoculadas via oral e no íleo 48 h PI de aves desafiadas via ração. Na avaliação imunoistoquímica, 12 h após inoculação as aves desafiadas via oral já apresentaram significativo aumento no número de células CD3+ no jejuno e nas 24 h PI significativo aumento destas células no íleo e ceco. Também foi realizado um estudo *in vitro* para avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) de 4 combinações de ácidos orgânicos frente a *Salmonella* Minnesota (SM). Os resultados da CIM foram: ácido A (composto de ácido lático, ácido fumárico, ácido cítrico e ácido fórmico): 3,12%, ácido B (composto de ácido fumárico e ácido cítrico): 0,78%, ácido C (composto de ácido propiônico e ácido fórmico): 1,56%, ácido D (composto de ácido acético, ácido fórmico, ácido cítrico e ácido ascórbico): 0,39%. No terceiro experimento foi avaliado a eficiência de diferentes ácidos orgânicos via água e ração em frangos desafiados com SM, onde foram alojados 30 frangos de corte do 1º ao 28º dias de idade, divididos em 6 seis tratamentos com 5 animais cada sendo T1 – Controle negativo não desafiado com SM, T2 – controle positivo desafiado com SM, T3 – animais desafiados com SM e tratados com ácido orgânico A na ração, T4 – animais desafiados com SM e tratados com ácido orgânico A na ração e ácido orgânico B na água, T5 – animais desafiados com SM e tratados com ácido orgânico C na ração e T6 – animais desafiados com SM e tratados com ácido C orgânico na ração e ácido D orgânico na água. Para avaliação microbiológica foram coletados suabes de cloacas 48 h após inoculação e papo e ceco 7 dias após inoculação. Observou-se redução significativa de SM no papo dos animais desafiados e tratados com ácidos orgânicos. Frente aos resultados observou-se que a SM tem rápida disseminação no trato gastrointestinal das aves, podendo ser isolada 12 h após inoculação via oral. Na análise histopatológica de segmentos intestinais é possível observar aumento inicial de células caliciformes e posterior aumento de linfócitos T em aves desafiadas. Nos experimentos onde utilizou-se ácidos orgânicos no controle de SM foi possível observar que a dose recomendada pelo fabricante

encontra-se abaixo daquela indicada pela CIM, o que pode ter resultado na baixa eficácia dos ácidos testados em animais desafiados.

Palavras-chave: Células CD3+, células caliciformes, Concentração Inibitória Mínima, imunoistoquímica

4.2 ABSTRACT

Salmonella control in poultry industry is of great importance to prevent foodborne diseases in humans. The intense control of *Salmonella* Enteritidis caused an increased isolation of other serotypes as *Salmonella* Minnesota (SM), and it cannot be affirmed that additives used to control *Salmonella* Enteritidis showed the same efficacy to control of other serovars. Therefore, the aim of this study was to evaluate the pathogenesis of SM in challenged broilers and the use of different combinations of organic acids for SM control in broilers. In the present study, three experiments were conducted. In the first experiment an *in vivo* study to evaluate the pathogenesis of the SM in broilers where the birds were divided into 4 treatments with 15 animals each: T1 - animals inoculated orally with SM, T2 - animals inoculated through feed with SM, T3 - "in-contact" birds caged with SM challenged birds and T4 - negative control. At 12, 24 and 48 hours after the challenge, the crop, duodenum, cecum and liver were collected to detect SM. It was also collected fragments of jejunum, ileum and cecum for histopathological and immunohistochemistry analysis. At the microbiological evaluation 12 h after inoculation, it has already been possible to observe the presence of SM in the crop, duodenum and cecum of birds challenged orally and through feed. 24 h after contact with the challenged birds, the in-contact group have already shown the presence of SM in crop and duodenum. It was observed a significant increase of goblet cells in the jejunum 24 h post inoculation (PI) in the orally inoculated birds, and in the ileum 48 h PI in the feed challenged birds. In immunohistochemical evaluation, 12 h PI the birds challenged orally have already shown a significant increase in the number of CD3+ cells in the jejunum and 24 h PI a significant increase of these cells in the ileum and cecum. In the second experiment an *in vitro* study was also performed to assess the minimum inhibitory concentration (MIC) of four combinations of organic acids against *Salmonella* Minnesota (SM). The MIC results were: acid A (lactic acid, fumaric acid, citric acid and formic acid): 3.12%, acid B (fumaric acid and citric acid): 0.78%, acid C (propionic acid and formic acid): 1.56%, acid D (acetic acid, formic acid, citric acid and ascorbic acid): 0.39%. In the third experiment it was evaluated the efficacy of different organic acids via water and food in chickens challenged with SM, where 30 broilers from 1st to 28th days of age were divided into six treatments with five animals each: T1 - negative control not challenged with SM, T2 - positive control challenged with SM, T3 - birds challenged with SM and treated with organic acid A in the feed, T4 - birds challenged with SM and treated with organic acid A in the feed and organic acid B in the water, T5 - birds challenged with SM and treated with organic acid C in the feed, T6 - birds challenged with SM and treated with organic acid C in the feed and organic acid D in the water. For microbiological evaluation cloacal swabs were collected 48 h PI and the crop and cecum were collected 7 days after inoculation. Only a significant reduction of SM in the crop of challenged birds and treat with organic acids was observed. Based on the results it was observed that SM has spread rapidly in the gastrointestinal tract of poultry and it could be isolated 12 h after oral inoculation. In histopathological analysis of intestinal segments it was possible to observe an initial increase of goblet cells and subsequent increase of lymphocytes T in challenged birds. In the experiments where the organic acids were used to control SM it was observed that the recommended dosage by the manufacturer is below that the indicated by the MIC, which may have resulted in the low efficiency of the acids tested in the challenged animals.

Key words: CD3⁺ cells, goblet cells, Minimum Inhibitory Concentration, Immunohistochemistry

4.3 INTRODUÇÃO

A *Salmonella* é um bacilo Gram-negativo e um dos mais importantes causadores de toxinfecção alimentar em seres humanos geralmente associados ao consumo de carne e ovos contaminados (Rabsch *et al.*, 2000). Para controlar *Salmonella*, as empresas avícolas empregam um estrito sistema de biossegurança, associado a ferramentas que auxiliam na redução do isolamento deste microrganismo em aves, como por exemplo, o uso de ácidos orgânicos na ração e/ou água de bebida (Bassan *et al.* 2008; Sterzo *et al.*, 2007). Entretanto prévios estudos indicam que estes aditivos podem funcionar frente a determinados sorovares, porém não apresentar a mesma eficiência frente a outros (Pickler *et al.*, 2012).

Também é observado que algumas salmonelas paratíficas, como a *Salmonella* Minnesota (SM) não causam sinais clínicos nas aves, de maneira que conhecer a patogenia e a resposta imunológica das aves frente este sorovar, também pode ser importante para buscar formas de controle.

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a patogenia da SM em frangos desafiados e o uso de diferentes combinações de ácidos orgânicos para o controle de SM em frangos de corte.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi dividido em três experimentos: um estudo *in vivo* para avaliar a patogenia da SM em frangos de corte desafiados; um estudo *in vitro* para avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) de diferentes combinações de ácidos orgânicos frente a *Salmonella* Minnesota (SM); e o terceiro experimento para avaliar a eficiência de diferentes combinações de ácidos orgânicos via água e ração em frangos desafiados com SM.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná sob protocolo número 011-2013.

Experimento 1

Animais, Tratamentos e Ambiente

Foram utilizados 65 frangos de corte da linhagem Cobb 500® de 1 a 4 dias de idade, divididos em 4 tratamentos (Tabela 1) com 15 animais cada, em um delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo cada ave uma repetição.

Tabela 1 – Descrição dos tratamentos do experimento 1

Tratamento	Desafio	Via
T1	<i>Salmonella</i> Minnesota 10 ⁵ UFC/mL	Oral
T2	<i>Salmonella</i> Minnesota 10 ⁵ UFC/mL	Ração
T3	<i>Salmonella</i> Minnesota	Contato
T4	Não desafiados	-

As aves foram alojadas em salas isoladas com piso coberto com cama de maravalha, com pressão negativa, limpas, desinfetadas e livres de *Salmonella*. A temperatura era controlada de acordo com a idade das aves e com fornecimento de água e ração *ad libitum*, seguindo as determinações do NRC (NRC, 1994).

Previamente a inoculação, cinco animais foram eutanasiados e necropsiados para coleta de fígado e ceco de forma a confirmar que os animais eram negativos para *Salmonella*.

Preparo do inóculo

Para o preparo do inóculo, uma colônia pura de SM isolada de frangos de corte e tipificada pela Fundação Oswaldo Cruz foi retirada do Ágar Nutriente (Oxoid®) e incubada em solução de BHI - Brain Heart Infusion (Oxoid®) por 24 h a 37° C. Esta solução foi diluída em solução fisiológica até a concentração 0,5 da escala de MacFarland e a turbidez foi aferida em espectrofotômetro. Procedeu-se a contagem do inóculo em Agar para Contagem de Colônias (Oxoid®).

Desafio das aves

Ao 2º dia de idade os animais foram desafiados, sendo o T1 inoculado via oral com 1 mL de SM na concentração 10⁵ UFC/mL. No grupo T2 o inóculo foi adicionado a ração dos animais e no grupo T3, 24 h após desafio as aves foram para o mesmo ambiente dos animais do T1 ficando em contato com as aves infectadas.

Coleta das amostras

Às 12, 24 e 48 h após o desafio, cinco animais de cada tratamento foram eutanasiados e necropsiados para a coleta asséptica de papo, duodeno, ceco e fígado, sendo os fragmentos submetidos a análises microbiológicas para detecção de presença ou ausência de SM.

Fragmentos de jejuno, íleo e ceco foram armazenados em solução de formalina 10% para análise de histopatologia para identificação e contagem de células caliciformes e de imunoistoquímica para identificação e contagem de linfócitos CD3+.

Análise de *Salmonella*

Para realização do procedimento de contagem de *Salmonella* as amostras foram diluídas em água peptonada 2% em proporção de 1:10. Retirou-se 1 mL da solução de água peptonada 2% que foi pipetado no tubo contendo 9 mL de água peptonada 0,1% e assim sucessivamente até a diluição 10^{-3} . Posteriormente retirou-se 100 μ L de cada diluição plaqueou-se em duplicata em meio XLD e o líquido foi espalhado com alça de Drigalsky. As placas foram incubadas em estufa regulada a 36° C por 24 h e submetidas à posterior contagem das colônias típicas. (Pickler *et al.*, 2012)

A solução inicial de água peptonada 2% foi incubada a 36° C por 24 h, em caso de não ter ocorrido crescimento de colônias típicas de *Salmonella* após 24 h de incubação, retirou-se 100 μ L da solução inicial em água peptonada 2% e acrescentou-se em um tubo contendo 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis, incubou-se em estufa regulada a 42° C por 24 h para confirmação de negatividade/positividade das amostras.

Os resultados das contagens de colônias foram expressos de acordo com Procedimentos de Contagem de Colônia de acordo com a Normativa nº62 (Brasil, 2003).

Histopatologia

As amostras de jejuno, íleo e ceco foram processadas rotineiramente para histologia e coradas com Alcian Blue (Smirnov *et al.*, 2004) para evidenciação e posterior contagem de células caliciformes, com leitura de 20 campos por tratamento em aumento de 100x realizado em microscópio óptico.

Imunoistoquímica

Os fragmentos de intestino para imunoistoquímica foram processadas como previamente descrito (Jeurissen *et al.*, 2000). Estes foram desparafinados em estufa a 60° C por 10 minutos e re-hidratadas em xilol e álcool. A recuperação antigênica foi realizada com Tampão Citrato pH 6,0 em banho-maria 100° C por 20 minutos com bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% e proteína bloqueadora, por 8 e 5 minutos respectivamente. O anticorpo primário utilizado foi o anti-CD3, diluído 1:700 por 90 minutos. Para detecção da reação foi utilizado anticorpos secundários anti-coelho e anti-camundongo

em um mesmo sistema de amplificação, kit ADVANCE®, por 40 minutos e para revelação utilizou-se um cromógeno, kit DAB®, por 5 minutos. A contra-coloração foi realizada com hematoxilina por 5 minutos após a desidratação e montagem das lâminas sinalizadas.

Nas amostras de jejuno, íleo e ceco foram realizadas a quantificação de células CD3+ por campo em aumento de 100x, com leitura de 20 campos por tratamento.

Experimento 2

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O teste de micro diluição em caldo foi realizado para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos ácidos orgânicos utilizados frente a SM. Utilizou-se microplacas com 96 poços com volume de 0,1 a 0,2 mL. O inóculo foi preparado a partir de uma colônia pura de SM armazenada em Agar Nutriente, incubada em caldo BHI a temperatura de 37° C por 24 h. Esta solução bacteriana foi diluída em solução fisiológica 0,9% até atingir a diluição correspondente ao tubo 0,5 da escala de Mac Farland. Em cada orifício da microplaca adicionou-se 100 µL de caldo Mueller Hinton. Posteriormente, adicionou-se 100 µL do produto a ser testado e procedeu-se diluições sucessivas deste. Em seguida, foi adicionado 10 µL da suspensão bacteriana em cada orifício. A microplaca foi incubada em estufa regulada a 37° C por 24 h. Para o procedimento de leitura foi utilizado indicador de crescimento bacteriano TTC (Triphenyl Tetrazolium Chloride) em solução de 1%. A CIM foi dada pela concentração mais baixa do produto testado que inibiu o crescimento bacteriano. Os testes foram conduzidos em triplicata. Este procedimento seguiu as orientações previamente descritas (NCCLS, 2003).

Foram testados quatro combinações de ácidos orgânicos: ácido orgânico A - composto de ácido láctico (140 g/kg), ácido fumárico (45 g/kg), ácido cítrico (50 g/kg) e ácido fórmico (100 g/kg); ácido orgânico B - composto de ácido fumárico (270 g/kg) e ácido cítrico (280 g/kg); ácido orgânico C - composto de ácido propiônico e ácido fórmico (concentrações não encontradas) e ácido orgânico D - composto de ácido acético, ácido fórmico, ácido cítrico e ácido ascórbico (concentrações não encontradas).

Experimento 3

Animais e instalações

Foram alojados 30 frangos de corte linhagem Cobb® 500, do 1° ao 28° dias de idade, divididos em 6 seis tratamentos com 5 animais cada, em delineamento experimental

inteiramente casualizado, onde cada animal era uma repetição de acordo com o descrito na Tabela 2. O alojamento das aves foi idêntico ao do Experimento 1.

Tabela 2 - Descrição dos tratamentos do experimento 3

GRUPO	DOSE	DESCRIÇÃO
T1	-	Controle sem inoculação e sem adição de produtos.
T2	-	Controle inoculado e sem adição de produtos.
T3	2 kg/t	Ácido orgânico A na ração – composto de ácido láctico, ácido fumárico, ácido cítrico e ácido fórmico.
T4	2 kg/t + 120 g/1000 L	Ácido orgânico A na ração e Ácido orgânico B via água - composto de ácido fumárico e ácido cítrico - com início do tratamento 3 dias após inoculação e administrado por 3 dias seguidos.
T5	2 kg/t	Ácido orgânico C na ração - composto de ácido propiônico e ácido fórmico.
T6	2 kg/t + 1 L/1000 L	Ácido orgânico C na ração e Ácido orgânico D via água - composto de ácido acético, ácido fórmico, ácido cítrico e ácido ascórbico - com início do tratamento 3 dias após inoculação e administrado por 3 dias seguidos.

Cepa e Inoculação

Aos 20 dias de idade os animais dos tratamentos 2 ao 6 foram inoculados com solução de SM na concentração $1,0 \times 10^5$ UFC/mL por via via oral. O preparo do inóculo foi idêntico ao do Experimento 1 (Pickler *et al.*, 2012).

Coleta de material para microbiologia

Foram realizados suabes de cloaca de todas as aves 48 h após inoculação para posterior contagem de *Salmonella*. Aos 7 dias após inoculação, 5 aves por tratamento foram eutanasiadas e necropsiadas para a coleta de forma asséptica do papo e do ceco e posterior contagem de *Salmonella*. O processamento das amostras foi idêntico ao do Experimento 1 (Pickler *et al.*, 2012).

Análise Estatística

Os dados foram avaliados por meio do programa estatístico Statistix 9 submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a 5% de probabilidade para as médias que apresentarem diferença significativa ou pelo teste de qui-quadrado para presença/ausência de *Salmonella*.

4.5 RESULTADOS

Experimento 1

As amostras das aves e do ambiente foram negativas para a *Salmonella* sp. nas análises realizadas ao primeiro dia, antes do período experimental e as aves não inoculadas mantiveram-se negativas durante todo o período experimental.

Os resultados obtidos da pesquisa microbiológica de SM nos diferentes órgãos das aves e em seus respectivos tratamentos estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados em número de aves positivas para *Salmonella* em relação ao total de aves analisadas nos diferentes órgãos de animais 12, 24 e 48 h após inoculação (PI)

Trat	12 h PI				24 h PI				48 h PI			
	Papo	Duod	Ceco	Fíg	Papo	Duod	Ceco	Fíg	Papo	Duod	Ceco	Fíg
VO	5/5 ^a	2/5 ^{ab}	4/5 ^a	1/5	4/5 ^a	3/5 ^a	5/5 ^a	1/5	5/5 ^a	4/5 ^a	5/5 ^a	2/5 ^a
VR	4/5 ^a	4/5 ^a	3/5 ^a	0/5	5/5 ^a	4/5 ^a	2/5 ^{ab}	1/5	4/5 ^a	3/5 ^a	5/5 ^a	3/5 ^a
CT	0/5 ^b	0/5 ^b	0/5 ^b	0/5	0/5 ^b	0/5 ^b	0/5 ^b	0/5	2/5 ^{ab}	1/5 ^{ab}	0/5 ^b	0/5 ^b
CN	0/5 ^b	0/5 ^b	0/5 ^b	0/5	0/5 ^b	0/5 ^b	0/5 ^b	0/5	0/5 ^b	0/5 ^b	0/5 ^b	0/5 ^b

^{a,b} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) para o teste de Qui-quadrado. VO – inoculados via oral; VR – inoculados via ração; CT – aves contato; CN – controle negativo. Duod – duodeno. Fig – fígado.

Os resultados da contagem (média e desvio padrão) de células caliciformes, células CD3+ e relação caliciformes: CD3+ , 12, 24 e 48 h após inoculação (PI) estão expressos na Figura 1.

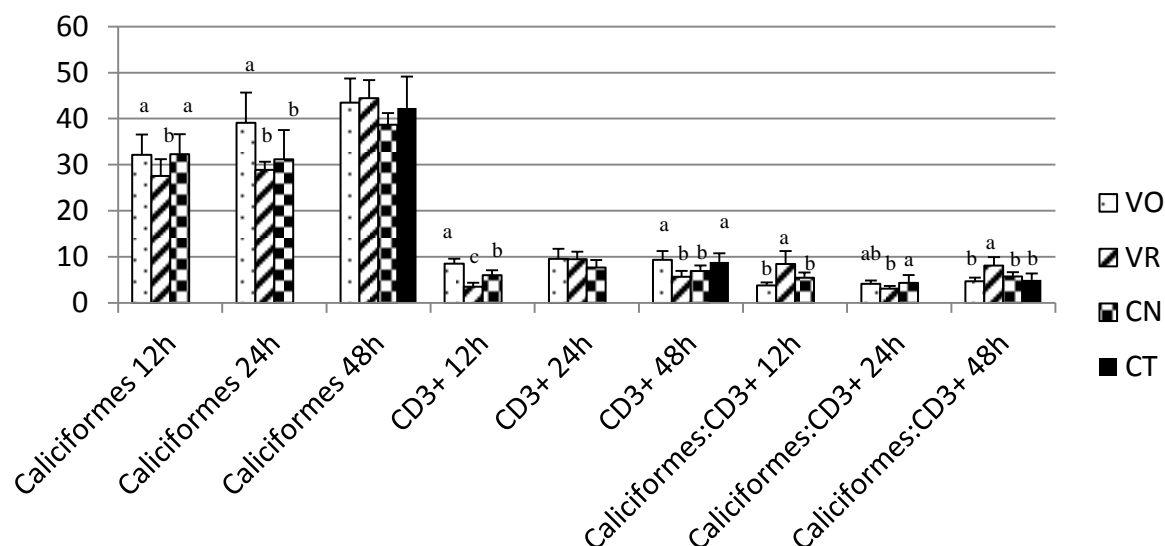


Figura 1 – Contagem (média e desvio padrão) de células caliciformes, células CD3+ e relação caliciformes:CD3+ no jejuno às 12, 24 e 48h após inoculação. VO – inoculados via oral; VR – inoculados via ração; CN – controle negativo; CT – aves contato.

^{a,b} Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre tratamentos.

Os resultados da contagem (média e desvio padrão) de células caliciformes, células CD3+ e relação caliciformes:CD3+ no íleo às 12, 24 e 48 h após inoculação estão expressos na Figura 2.

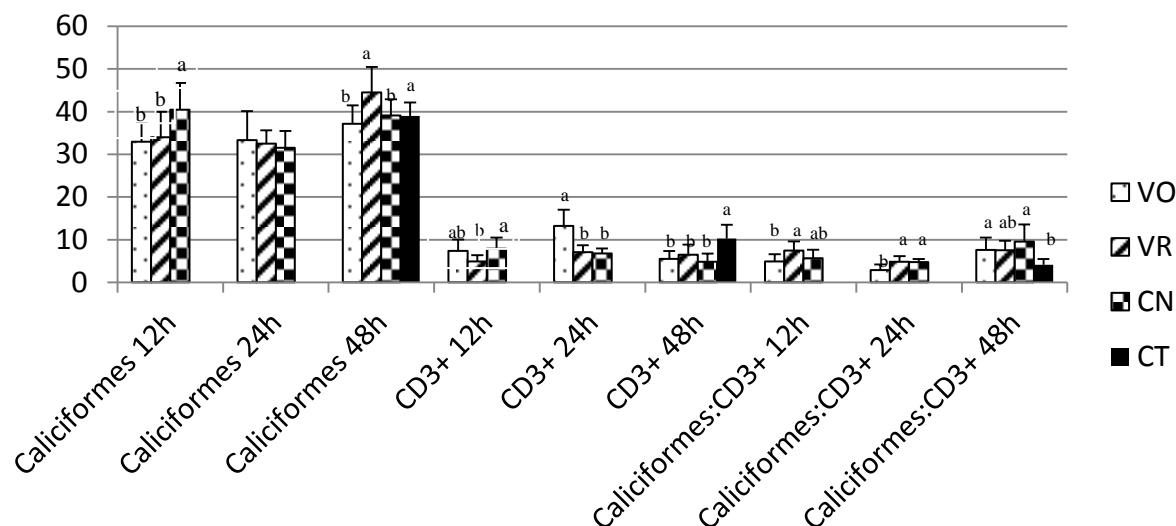


Figura 2 – Contagem (média e desvio padrão) de células caliciformes, células CD3+ e relação caliciformes:CD3+ no íleo às 12, 24 e 48 h após inoculação. VO – inoculados via oral; VR – inoculados via ração; CN – controle negativo; CT – aves contato.

^{a,b} Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre tratamentos.

Os resultados da contagem (média e desvio padrão) de células caliciformes, células CD3+ e relação caliciformes:CD3+ no ceco às 12, 24 e 48 h após inoculação estão expressos na Figura 3.

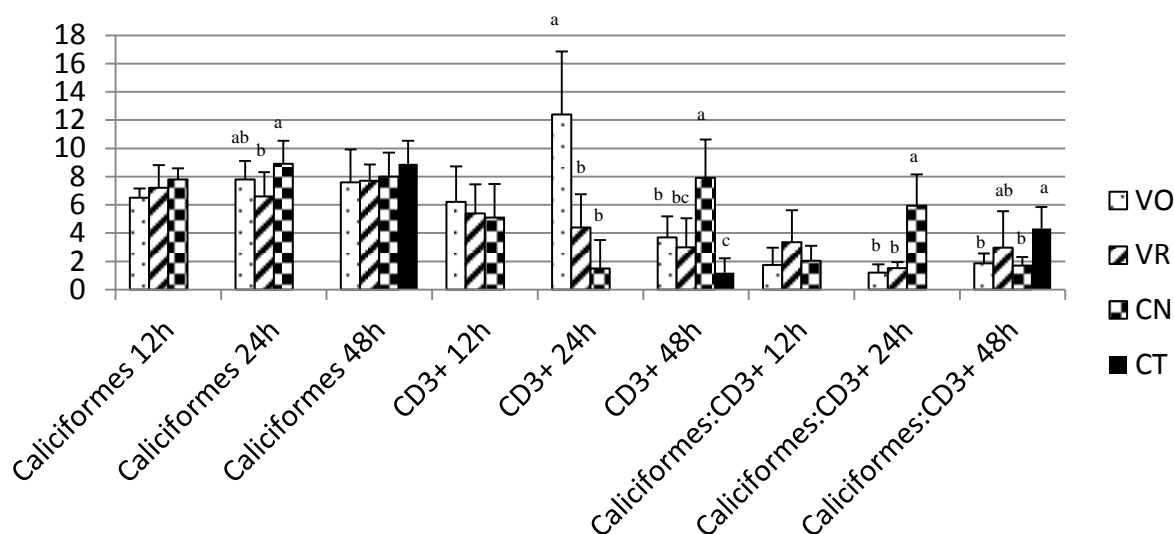


Figura 3 - Contagem (média e desvio padrão) de células caliciformes, células CD3+ e relação caliciformes:CD3+ no ceco às 12, 24 e 48 h após inoculação. VO – inoculados via oral; VR – inoculados via ração; CN – controle negativo; CT – aves contato.

^{a,b} Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre tratamentos.

Experimento 2

Os resultados da CIM da combinação de diferentes ácidos orgânicos testados e a comparação com as doses utilizadas no Experimento 3 estão expressos na Tabela 4.

Tabela - 4. Resultados da concentração inibitória mínima (CIM) dos diferentes ácidos orgânicos e dose utilizada no experimento *in vivo*

Ácido orgânico*	CIM (%)	Dose Utilizada (%)
Ácido A	3,12	0,2
Ácido B	0,78	0,012
Ácido C	1,56	0,2
Ácido D	0,39	0,001

* Ácido A – composto de ácido lático, ácido fumárico, ácido cítrico e ácido fórmico; Ácido B - composto de ácido fumárico e ácido cítrico; Ácido C - composto de ácido propiônico e ácido fórmico; Ácido D - composto de ácido acético, ácido fórmico, ácido cítrico e ácido ascórbico.

Experimento 3

As amostras das aves e do ambiente foram negativas para a *Salmonella* sp. nas análises realizadas ao primeiro dia, antes do período experimental e as aves não inoculadas mantiveram-se negativas para SM durante todo o período experimental.

Os resultados das contagens de *Salmonella* em suabes 48 h PI, papo e ceco aos 7 dias após inoculação estão expressos na Tabela 5.

Tabela 5 – Média e desvio padrão da contagem de *Salmonella* em suabes de cloaca 48 h após inoculação, papo e ceco 7 dias após inoculação nos diferentes tratamentos (Resultados expressos em Log 10)

Tratamentos	Suabes de cloaca	Papo	Ceco
1- Controle Negativo	0,00±0,00 b	0,00±0,00 c	0,00±0,00 b
T2 - Controle positivo	4,05±0,40 a	3,85±1,44 a	4,74±1,06 a
T3 - Ácido A na ração	3,90±0,30 a	2,45±1,49 b	4,60±1,47 a
T4 - Ácido A na ração e Ácido B na água	**	2,05±1,59 b	3,76±1,67 a
T5 - Ácido C na ração	3,31±1,51 a	2,20±1,58 b	4,58±1,49 a
T6 - Ácido C na ração e Ácido D na água	**	2,22± 1,62 b	3,34± 2,08 a
Valor de P	0,0001	0,0001	0,0001

* Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa $P < 0,05$ no teste de T.

** O produto ainda não havia sido acrescido na água de bebida neste momento.

4.6 DISCUSSÃO

A porta de entrada da *Salmonella* são as células M presentes nas placas de Peyer. Uma vez no hospedeiro, este microrganismo rapidamente migra para vários órgãos como baço e fígado onde rapidamente se replicam nos fagócitos (Jones e Falkow, 1996). No presente estudo, 12 h após inoculação já foi possível detectar a presença da SM no fígado, papo, duodeno e ceco nas aves inoculadas via oral, demonstrando esta rápida migração no organismo da ave. Estudos similares utilizando *Salmonella* Enteritidis, o microrganismo foi isolado de papo das aves 3 h após inoculação e nas 12 h após inoculação a bactéria já estava presente em proventrículo, duodeno, bolsa cloacal, coração e fígado das aves (Desmidt *et al.*, 1997), demonstrando que estes dois sorovares se comportam de maneira similar nas primeiras horas após a infecção via oral. Estudos com ratos demonstram que isso ocorre de forma

similar também em mamíferos onde, a presença da *Salmonella* Typhimurium foi observada nas placas de Peyer 3 h após infecção via oral e expressivo aumento da bactéria nas placas de Peyer e baço entre o período de 24-48 h após inoculação. (Mcsorley *et al.*, 2002). Para as aves do grupo que permaneceu em contato com as aves desafiadas via oral, 24 h após contato, a presença de SM foi observada no papo e duodeno, demonstrando que os frangos do grupo inoculado via oral já eliminavam a bactéria no ambiente. A propagação desta bactéria para o fígado das aves contato não aconteceu neste mesmo período de tempo como observado nas aves inoculadas ou que consumiram a ração contaminada, é provável que a dose infectante que as aves são expostas via contato seja menor que a daquela dose recebida pelas aves inoculadas por via oral ou via ração, assim sugere-se que a dose infectante esteja relacionada a sua maior disseminação a órgãos como fígado. Entretanto mais estudos são necessários para comprovar isso.

Quanto à dinâmica celular na mucosa intestinal, no presente estudo, observou-se expressivo aumento de células caliciformes em jejuno, 24 h após inoculação via oral e no íleo 48 h após inoculação de aves desafiadas via ração. As células caliciformes presentes nas vilosidades intestinais são produtoras de muco e participam da resposta imunológica inata, sendo a primeira barreira de defesa frente agressões no trato gastrointestinal. A produção de muco por estas células durante a infecção por *Salmonella* é mediada pelo fator de necrose tumoral α (Arnold *et al.*, 1993) e pelo interferon γ (Songhet *et al.*, 2011). Observou-se aumento destas células no jejuno de aves desafiadas com *Salmonella* Typhimurium (Fasina *et al.*, 2010) e hipertrofia das células caliciformes no íleo de ratos desafiados com *Salmonella* Hadar 120 h após desafio (Afaf e Maan, 2010).

A resposta imune celular é considerada mais importante para o desenvolvimento da resposta protetora a *Salmonella* do que a imunidade humoral e produção de anticorpos (Desmidt *et al.*, 1998). Porém, a resposta imunológica mediada por células é pouco relatada na literatura. Estudos demonstraram que infecções por *Salmonella* Enteritidis em frangos resultam na redução de células imunológicas na circulação sanguínea devido a migração dessas células para o sítio de ação. O estudo demonstra redução na proporção de células CD4⁺: CD8⁺ e TCRV2⁺ e redução na contagem absoluta de células CD4⁺, CD8⁺, TCRV1⁺, e MHC II^{bright+} (Beirao *et al.*, 2012). Também é observado migração de células CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺ para os sítios de infecção, com aumento dessas células em folículos ovarianos e ovários de galinhas 12 e 24 h após desafio com *Salmonella* Enteritidis (Barua e Yoshimura, 2004). Observou-se aumento de linfócitos T (CD4⁺) nos sítios de infecção até 3 h após desafio com *Salmonella* em ratos (Mcsorley *et al.*, 2002). No presente estudo, nas 12 h após

inoculação as aves desafiadas via oral já apresentaram aumento significativo no número de células CD3+ no jejuno e 24 h após inoculação, significativo aumento destas células no íleo e ceco com relação aos demais tratamentos. Da mesma forma, 24 h após inoculação também foi observado aumento no isolamento deste microrganismo no papo, duodeno e ceco das aves inoculadas via oral e via ração. Isso sugere que a invasão tecidual por *Salmonella* Minnesota, resulta em aumento das células T nos tecidos avaliados como já demonstrados para outros sorovares (Barua e Yoshimura, 2004; Desmidt *et al.*, 1998).

O uso de ácidos orgânicos no controle de salmonelose em frangos é bastante relatado, porém poucos são os trabalhos que avaliam o seu uso frente SM. Os ácidos orgânicos podem apresentar distintos mecanismos de ação. Podem atravessar de forma passiva a membrana celular bacteriana e reduzir o pH no interior da célula, alterando processos metabólicos vitais como o gradiente de prótons e a carga com o exterior, interferir no transporte de aminoácidos e fosfatos e inativar algumas enzimas. Pode ocorrer aumento da pressão osmótica celular, que desencadeia mecanismos de compensação de carga elétrica aumentando os níveis de sódio, potássio ou glutamato e a força iônica intracelular, provocando aumento da pressão mecânica sobre a parede do microrganismo, o que faz com que essa se rompa (Russell, 1992). Porém, foi observado que concentrações inibitórias de ácido sórbico não alteram o pH no citoplasma e os autores acreditam que o primeiro sítio de ação dos ácidos orgânicos seja a membrana plasmática (Stratford *et al.*, 2009).

No experimento 2, todos os ácidos orgânicos inibiram a SM *in vitro* assim como na avaliação microbiológica do papo (experimento 3), todos os ácidos orgânicos testados foram significativamente eficientes em reduzir a contagem de *Salmonella* em relação ao controle positivo. Porém no ceco e no suabe de cloaca, 48 h após inoculação, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos com relação ao grupo controle.

Observa-se que as doses utilizadas no experimento *in vivo*, recomendadas pelos fabricantes, estão abaixo daquelas determinadas pela CIM, o que pode ter ocasionado baixa eficiência dos ácidos orgânicos testados no ceco. A utilização de sub doses pode induzir a tolerância aos ácidos orgânicos frente a *Salmonella*. Esta tolerância da *Salmonella* a baixos valores de pH está relacionada a um mecanismo de defesa envolvendo cerca de 50 proteínas conhecidas como *acid shock proteins* que participam do sistema de tolerância ao ácido (ATR) responsáveis por minimizar os efeitos letais da redução de pH na *Salmonella* (Foster, 1993). Além disso, ácidos orgânicos reduzem a expressão de genes *hilA*, *invF* e *sipC* relacionados com as ilhas de patogenicidade 1 (SPI-1) (Kwon e Ricke, 1998) e podem favorecer a sobrevivência da *Salmonella* nos macrófagos (Van-Immerseel *et al.*, 2006). Alguns autores

também demonstraram que a *Salmonella* Typhimurium exposta às condições ácidas por curtos períodos de tempo também desenvolvem o ATR (Bang *et al.*, 2002; Koutsoumanis e Sofos, 2004).

Para a efetiva atuação dos ácidos orgânicos no ceco, também é importante que eles sejam protegidos, de forma que não se dissociem completamente na parte superior do trato gastrointestinal. Em prévios estudos, observou-se que o ácido láctico encapsulado foi efetivo no controle de *Salmonella* sp. no jejuno de frangos de corte, porém o mesmo ácido orgânico teve sua eficiência comprometida quando fornecido na forma não encapsulada. (Natsir *et al.*, 2010). Isso pode explicar o fato de os ácidos orgânicos utilizados no presente estudo tenham atuado somente no papo das aves, não apresentando efeito significativo no ceco, principal sítio de ação da SM.

Para o controle efetivo da *Salmonella* é importante a realização de avaliações *in vivo* e *in vitro* para determinar a concentração adequada de ácidos orgânicos de forma a não induzir tolerância. Mais estudos devem ser realizados para determinar a tolerância da *Salmonella* Minnesota frente aos ácidos orgânicos.

4.7 CONCLUSÕES

A *Salmonella* Minnesota após sua entrada pelo TGI migra rapidamente para o fígado e ceco onde foi isolada 12 h após inoculação nas aves desafiadas via oral. A invasão tecidual por *Salmonella* pode resultar em aumento das células caliciformes e células T nos tecidos de aves desafiadas.

Todos os ácidos orgânicos testados reduziram a SM no papo aos 7 dias após inoculação, mas nenhum reduziu a SM nas 48 h após inoculação nos suabes de cloaca e ceco das aves desafiadas aos 7 dias após inoculação. As doses dos ácidos orgânicos recomendadas pelos fabricantes e utilizados *in vivo*, estão abaixo daquelas recomendadas pela CIM, o que pode ter ocasionado o insucesso do tratamento podendo também induzir a tolerância da *Salmonella* aos ácidos orgânicos.

4.8 REFERÊNCIAS

Afaf, A.Y.; Maan, M.N.a.L.N. Ultrastructural changes in the ileum of white BALB/C mice experimentally infected with *Salmonella* Hadar. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v. 5, n. 3, p. 196-201, 2010.

Arnold, J.W.; Klimpel, G.R.; Niesel, D.W. Tumor necrosis factor (TNF α) regulates intestinal mucus production during Salmonellosis. **Cellular Immunology**, v. 151, n. 2, p. 336-344, 1993.

Bang, I.S.; Audia, J.P.; Park, Y.K.; Foster, J.W. Autoinduction of the ompR response regulator by acid shock and control of the *Salmonella enterica* acid tolerance response. **Molecular Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1235-1250, 2002.

Barua, A.; Yoshimura, Y. Ovarian cell-mediated immune response to *Salmonella* Enteritidis infection in laying hens (*Gallus domesticus*). **Poultry Science**, v. 83, n. 6, p. 997-1002, 2004.

Bassan, J.D.L.; Flôres, M.L.; Antoniazzi, T.; Bianchi, E.; Kuttel, J.; Trindade, M.M. Controle da infecção por *Salmonella* Enteritidis em frangos de corte com ácidos orgânicos e mananoligossacarídeo. **Ciência Rural**, v. 38, p. 1961-1965, 2008.

Beirao, B.C.; Favaro, C., Jr.; Nakao, L.S.; Caron, L.F.; Zanata, S.M.; Mercadante, A.F. Flow cytometric immune profiling of specific-pathogen-free chickens before and after infectious challenges. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 145, n. 1-2, p. 32-41, 2012.

Brasil. Instrução Normativa 6, de 26 de agosto de 2003. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**, 2003.

Desmidt, M.; Ducatelle, R.; Haesebrouck, F. Pathogenesis of *Salmonella* Enteritidis phage type four after experimental infection of young chickens. **Veterinary Microbiology**, v. 56, n. 1-2, p. 99-109, 1997.

Desmidt, M.; Ducatelle, R.; Haesebrouck, F. Serological and bacteriological observations on experimental infection with *Salmonella* Hadar in chickens. **Veterinary Microbiology**, v. 60, n. 2-4, p. 259-269, 1998.

Fasina, Y.O.; Hoerr, F.J.; Mckee, S.R.; Conner, D.E. Influence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection on intestinal goblet cells and villous morphology in broiler chicks. **Avian Disease**, v. 54, n. 2, p. 841-847, 2010.

Foster, J.W. The acid tolerance response of *Salmonella* Typhimurium involves transient synthesis of key acid shock proteins. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 7, p. 1981-1987, 1993.

Jeurissen, S.H.; Claassen, E.; Boonstra-Blom, A.G.; Vervelde, L.; Marga-Janse, E. Immunocytochemical techniques to investigate the pathogenesis of infectious micro-organisms and the concurrent immune response of the host. **Developmental and comparative immunology**, v. 24, n. 2-3, p. 141-151, 2000.

Jones, B.D.; Falkow, S. Salmonellosis: host immune responses and bacterial virulence determinants. **Annual Review in Immunology**, v. 14, p. 533-561, 1996.

Koutsoumanis, K.P.; Sofos, J.N. Comparative acid stress response of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium after habituation at different pH conditions. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 321-326, 2004.

Kwon, Y.M.; Ricke, S.C. Induction of acid resistance of *Salmonella* Typhimurium by exposure to short-chain fatty acids. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, n. 9, p. 3458-3463, 1998.

Mcsorley, S.J.; Asch, S.; Costalonga, M.; Reinhardt, R.L.; Jenkins, M.K. Tracking salmonella-specific CD4 T cells in vivo reveals a local mucosal response to a disseminated infection. **Immunity**, v. 16, n. 3, p. 365-377, 2002.

Natsir, M.H.; Sjoefjan, O.; Umam, K.; Manab, A.; Widodo, E. Effects of liquid and encapsulated lactic acid in broiler diets on performances, intestinal characteristics and intestinal microflora. **Journal of Poultry Science**, v. 47, n. 3, p. 240-243, 2010.

NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 2003.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of poultry**, v. 9, 1994.

Pickler, L.; Hayashi, R.M.; Lourenço, M.C.; Miglino, L.B.; Caron, L.F.; Beirão, B.C.B.; Silva, A.V.F.; Santin, E. Avaliação microbiológica, histológica e imunológica de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis e Minnesota e tratados com ácidos orgânicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. p. 27-36, 2012.

Rabsch, W.; Hargis, B.M.; Tsoilis, R.M.; Kingsley, R.A.; Hinz, K.H.; Tschape, H.; Baumler, A.J. Competitive exclusion of *Salmonella* Enteritidis by *Salmonella* Gallinarum in poultry. **Emerging Infectious Disease**, v. 6, n. 5, p. 443-448, 2000.

Russell, J.B. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. **Journal of Applied Microbiology**, v. 73, n. 5, p. 363-370, 1992.

Smirnov, A.; Sklan, D.; Uni, Z. Mucin dynamics in the chick small intestine are altered by starvation. **Journal of Nutrition**, v. 134, n. 4, p. 736-742, 2004.

Songhet, P.; Barthel, M.; Stecher, B.; Muller, A.J.; Kremer, M.; Hansson, G.C.; Hardt, W.D. Stromal IFN- γ -signaling modulates goblet cell function during *Salmonella* Typhimurium infection. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. 28, 2011.

Sterzo, E.V.; Paiva, J.B.; Mesquita, A.L.; Freitas Neto, O.C. A. Organic acids and/or compound with defined microorganisms to control *Salmonella enterica* serovar Enteritidis experimental infection in chickens. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 9, p. 69-73, 2007.

Stratford, M.; Plumridge, A.; Nebe-Von-Caron, G.; Archer, D.B. Inhibition of spoilage mould conidia by acetic acid and sorbic acid involves different modes of action, requiring modification of the classical weak-acid theory. **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, n. 1, p. 37-43, 2009.

Van-Immerseel, F.; Russell, J.B.; Flythe, M.D.; Gantois, I.; Timbermont, L.; Pasmans, F.; Haesebrouck, F.; Ducatelle, R. The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. **Avian Pathology**, v. 35, n. 3, p. 182-188, 2006.

**CAPÍTULO 5 - ANÁLISE RETROSPECTIVA DE RESULTADOS DE
MICROBIOLOGIA E DINÂMICA CELULAR IMUNOLÓGICA DE AVES
DESAFIADAS COM *SALMONELLA ENTERICA* SOROVARES ENTERITIDIS,
MINNESOTA E HEIDELBERG**

5 ANÁLISE RETROSPECTIVA DE RESULTADOS DE MICROBIOLOGIA E DINÂMICA CELULAR IMUNOLÓGICA DE AVES DESAFIADAS COM *SALMONELLA ENTERICA* SOROVARES ENTERITIDIS, MINNESOTA E HEIDELBERG

Retrospective analysis of microbiology and immune cellular dynamics results of chickens challenged against Salmonella enterica serovars Enteritidis, Minnesota and Heidelberg.

5.1 RESUMO

O presente estudo apresenta a análise retrospectiva de microbiologia e da resposta imunológica celular de aves desafiadas com *Salmonella* Enteritidis (SE), *Salmonella* Minnesota (SM) e *Salmonella* Heidelberg (SH) de diferentes estudos conduzidos nos últimos 5 anos em nosso laboratório. O objetivo foi entender a progressão da *Salmonella* e alteração na histologia e dinâmica da imunidade celular em frangos. Foram utilizados resultados de análises microbiológicas de ceco, análises de alterações histológicas e quantificação de células CD4+, CD8+ e células caliciformes do íleo e ceco de aves desafiadas ou não com os diferentes sorovares de *Salmonella*. Na avaliação microbiológica do ceco, aves desafiadas com SE apresentaram significativa redução na contagem dos 2 aos 7 dias pós desafio (dpd) e posterior aumento aos 14 dpd voltando a atingir concentrações de 10^3 UFC/g e assim permanecendo até 28 dpd. Para aves desafiadas com SM e SH as contagens no ceco mantiveram-se constantes entre 1 dpd e 21 dpd com concentrações de 10^4 e 10^5 UFC/g até 28 dpd quando foi observada significativa redução na contagem para 10 UFC/g. Na avaliação da dinâmica celular foi possível observar que para todos os sorovares avaliados ocorre aumento inicial de células CD4+ tanto no íleo, como no ceco. Quando se avalia a contagem bacteriana no ceco e a dinâmica de células CD8+ é possível observar no caso da SE, aumento na contagem de *Salmonella* e aumento quantidade de células CD8+ ao final do período avaliado; para SM, a redução na contagem bacteriana no ceco ocasionou redução nas células CD8+ ao final do período avaliado e no caso de SH mesmo com redução na contagem bacteriana a quantidade de células CD8+ permaneceu alta ao final do período avaliado. A quantidade de salmonela no ceco e a mobilização de células imunológicas no trato gastrintestinal de frangos desafiados é dependente do sorovar avaliado.

Palavras-chave: frangos, células caliciformes, linfócitos, microbiologia e imunoistoquímica

5.2 ABSTRACT

The present study presents a retrospective analysis of microbiology and cellular immune response from chickens challenged against *Salmonella* Enteritidis (SE), *Salmonella* Minnesota (SM) and *Salmonella* Heidelberg (SH) from different studies carried out from 2011 to 2015 at Avian Pathology and Microbiology Laboratory. The objective was to better understand the progression of *Salmonella* isolation, histological alteration and immune cellular dynamics in challenge birds. Results of cecum microbiological analysis, histological alteration analysis and quantification of CD4+ and CD8+ cells and ileum and cecum goblet cells of challenged or non-challenged birds with different serovars of *Salmonella* were used. Microbiological evaluation of cecum from birds challenged with SE showed a significant reduction in the count from 2 to 7 days post-challenge (dpc) and subsequent increase to 14 dpc back to reach concentrations of 10^3 CFU/g and remained so until 28 dpc. For birds

challenged with SM and SH, count in cecum remained constant between 1 and 21 dpc with concentrations of 10^4 and 10^5 CFU/g until 28 dpc when there was a significant reduction in count to 10 CFU/g. Analysing cellular dynamics, it was observed that for all evaluated serovars there was an initial increase of CD4+ cells both in ileum and cecum. When evaluating the bacterial count in cecum and CD8+ cell dynamics it is possible to observe for SE an increase in *Salmonella* count and an increase number of CD8+ cells at the end of the evaluation period; for SM, reduction in bacterial count in cecum caused a decrease in CD8+ cells at the end of the study period and for SH even with a reduction in bacterial count the number of CD8+ cells remained high at the end of the study period. The amount of *Salmonella* in cecum and the mobilization of immune cells in the gastrointestinal tract of challenged chickens depend on the assessed serovar.

Key-words: chickens, goblet cells, lymphocytes, microbiology, immunohistochemistry.

5.3 INTRODUÇÃO

Toxinfecções alimentares causadas pelo consumo de carne e ovos contaminados com *Salmonella* sp., teve significativo aumento nos últimos anos (Conceição *et al.*, 2007; Voss-Rech *et al.*, 2015; CDC 2015). De acordo com o Centers for Disease Control and Prevention (CDC, 2015) em setembro de 2015, 252 casos de *Salmonella* em pessoas foram reportados nos Estados Unidos da América e os sorovares Enteritidis, Hadar, Indiana e Muenchen foram os principais envolvidos. Em estudo realizado no Brasil, foram encontrados 20 sorovares diferentes em amostras de frangos e a *Salmonella enterica* sorovares Enteritidis (SE), Minnesota (SM) e Heidelberg (SH) foram os mais prevalentes (Voss-Rech *et al.*, 2015).

Salmonella é um patógeno facultativo intracelular e a resposta imunológica tem um importante papel na eliminação do patógeno *in vivo*, com participação ativa de células T (Holt *et al.*, 2010). Setta *et al.* (2012) descreveram diferentes efeitos na dinâmica imunológica celular de aves desafiadas com *Salmonella* Infantis, Enteritidis, Pullorum e Gallinarum. Muniz *et al.* (2015) também observaram que o efeito do desafio com *Salmonella* no desempenho zootécnico estava associado com alterações na dinâmica imunológica celular da mucosa do íleo e ceco, promovida por diferentes sorovares de *Salmonella*.

Entretanto, como os Comitês de Ética no Uso de Animais consideram o desafio de animais com *Salmonella* um método invasivo, o número de animais que podem ser utilizados em experimentos *in vivo* é sempre muito restrito. Dessa forma, meta-análises e estudos retrospectivos podem auxiliar na compreensão de diferentes processos associados com a infecção por *Salmonella*, sem submeter mais animais ao desafio.

Com o objetivo de melhor entender a progressão do isolamento de *Salmonella*, alterações histológicas e dinâmica da resposta imunológica celular em aves desafiadas, o presente estudo apresenta uma análise retrospectiva da microbiologia e da resposta imunológica de aves desafiadas com *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Minnesota e *Salmonella* Heidelberg de diferentes estudos realizados nos últimos cinco anos.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada uma análise retrospectiva de 10 experimentos conduzidos no Laboratório de Microbiologia e Ornitopatologia da Universidade Federal do Paraná, Brasil, entre os anos de 2011 a 2015. Todos os experimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética do uso de animais da mesma Universidade.

Animais e Alojamento

Todas as aves utilizadas nos experimentos foram adquiridas do mesmo incubatório e pertenciam a Linhagem Cobb 500® e não receberam vacinas contra *Salmonella* ou qualquer tipo de aditivo na ração ou água de bebida durante todo o período experimental.

As aves foram alojadas em salas isoladas, com pressão negativa, cama de maravalha e com temperatura controlada de acordo com a idade dos animais. A cama de maravalha utilizada em todos os experimentos foi autoclavada a 121° C por 15 minutos, todos os equipamentos utilizados foram desinfetados e esterilizados para evitar a contaminação dos animais com *Salmonella* ou outros microrganismos patogênicos, que não o desafio.

A dieta era à base de milho e soja com níveis iguais ou superiores aos recomendados pelo NRC (NRC, 1994), sem antibióticos promotores de crescimento, anticoccidianos ou outros aditivos alimentares. As aves receberam água e alimento à vontade durante todo período experimental.

Desafio

De acordo com o experimento, as aves eram inoculadas por via oral com cepas de campo, isoladas de frangos de corte pertencentes aos sorovares Enteritidis, Minnesota ou Heidelberg. A data de desafio e a dose de desafio estão descritos na Tabela 1. A preparação do inóculo foi realizada de acordo com previamente descrito por Pickler *et al.* (2012).

Análise de *Salmonella*

Para realização da análise microbiológica, ceco foi coletado de animais eutanasiados e necropsiados ao 2º, 4º, 7º, 14º, 21º e 28º dia pós-desafio e acondicionados em sacos plásticos esterilizados. O total de 454 amostras de ceco foram analisadas, sendo que 227 pertenciam ao controle negativo (não desafiados com *Salmonella*), 99 amostras pertenciam a aves desafiadas com SE, 48 amostras pertenciam a aves desafiadas com SM e 80 amostras era de aves desafiadas com SH.

O procedimento para contagem de *Salmonella* foi realizado de acordo com previamente descrito (Pickler *et al.*, 2012). As amostras de ceco foram homogeneizadas na proporção de 1:10 em solução de água peptonada tamponada. Diluições sucessivas foram conduzidas em tubos com 9 mL de água peptonada tamponada até que a diluição 10⁻³ fosse atingida. Alíquotas de 100 µL de cada tubo foram transferidas para placas de Ágar Verde Brilhante em duplicata com 1% de Novobiocina e o líquido foi homogeneamente espalhado com alça de Drigalsky. As placas foram incubadas a 35° C por 24 h, e após este período colônias típicas de *Salmonella* eram contadas. A água peptonada tamponada inicial também

foi incubada a 35° C por 24 h e caso não ocorresse o crescimento de colônias típicas de *Salmonella*, 100 µL da suspensão era adicionado ao caldo seletivo Rappaport-Vassiliadis e 1 mL era adicionado ao caldo Tetrationato iodado e incubado à 42° C por 24 h para confirmar a negatividade ou positividade da amostra. Para a confirmação do sorovar as amostras eram enviadas ao setor de Enterobactérias da Fundação Osvaldo Cruz, Brasil. A contagem de colônias era realizada de acordo com a Normativa 62 de 26 de agosto de 2003, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil – 2003).

Tabela 1 – Descrição do sorovar de *Salmonella data* de desafio e dose do desafio utilizadas na análise retrospectiva

Sorovar	Desafio (dia de idade)	Dose de inoculação (UFC/mL/ave)
<i>S. Enteritidis</i>	14	10 ⁸
<i>S. Enteritidis</i>	14	10 ⁵
<i>S. Enteritidis</i>	14	10 ⁸
<i>S. Enteritidis</i>	7	10 ⁸
<i>S. Enteritidis</i>	7	10 ⁸
<i>S. Enteritidis</i>	7	10 ⁶
<i>S. Heidelberg</i>	3	10 ⁷
<i>S. Heidelberg</i>	7	10 ⁶
<i>S. Heidelberg</i>	14	10 ⁸
<i>S. Minnesota</i>	7	10 ⁶
<i>S. Minnesota</i>	20	10 ⁵

Análise Histológica

Para análise histológica e avaliação de células caliciformes, íleo e ceco de aves eutanasiadas e necropsiadas foram coletadas em solução de formalina 10% ao 1°, 2°, 4°, 18°, 21° e 28° dia pós-desafio e processadas de acordo com Smirnov *et al.* (2004). Brevemente, as amostras foram incluídas em parafina e cortes de 5 µm foram preparados e montados em lâminas de vidro e corados com Hematoxilina e Eosina (HE) e Alcian Blue. A análise histológica foi realizada de acordo com Mesa *et al.* (2014) e a avaliação incluía dilação de vasos, fusão de vilosidades, infiltração de linfócitos, edema e congestão da lâmina própria, infiltração de células plasmáticas no epitélio e necrose apical que receberam escores de acordo com a severidade (zero = sem lesão; 1 = lesão leve; 2 = lesão moderada e 3 = lesão

severa). O número de células caliciformes por campo no íleo e ceco foi também avaliado em microscópio óptico (2 campos por amostra, aumento de 1000x).

Foram avaliados 75 amostras de íleo: 35 amostras pertenciam ao controle negativo (não desafiados com *Salmonella*), 20 amostras pertenciam a aves desafiadas com SE, 10 amostras pertenciam a aves desafiadas com SM e 10 amostras de aves desafiadas com SH.

Foram avaliados 60 amostras de ceco: 30 amostras pertenciam ao controle negativo (não desafiado com *Salmonella*), 20 amostras pertenciam a aves desafiadas com SE e 10 amostras pertenciam a aves desafiadas com SM.

Análise de imunoistoquímica

Amostras de íleo e ceco de aves eutanasiadas e necropsiadas foram coletadas ao 1º, 2º, 4º, 14º e 18º dia pós-desafio e armazenadas - 20º C.

Para avaliação de células CD4+ e CD8+, análise de imunoistoquímica foi realizada de acordo com Pickler *et al.* (2012). O número de células CD4+ e CD8+ por campo foi realizado em microscópio óptico (2 campos/amostra, aumento de 1000x).

Foram avaliados 100 amostras de íleo. Deste total, 50 amostras pertenciam ao controle negativo (aves não desafiadas com *Salmonella*), 20 amostras pertenciam a aves desafiadas com SE, 10 amostras de aves desafiadas com SM e 20 amostras de aves desafiadas com SH.

Foram avaliados 80 amostras de ceco. Deste total, 40 amostras pertenciam ao controle negativo, 20 amostras pertenciam a aves desafiadas com SE, 10 amostras pertenciam a aves desafiadas com SM e 10 amostras de aves desafiadas com SH.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o programa Statistix for Windows Copyright© 2008. Os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk e posteriormente a ANOVA e teste de Tukey à 5%. A contagem de *Salmonella* (UFC/g) foi transformada em Log10 para realização da análise estatística. Comparação entre o controle negativo e os diferentes sorovares em diferentes períodos pós-desafio foi realizado para contagem de *Salmonella*, escore de alteração, número de células caliciformes, CD4+ e CD8+ por campo.

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise de *Salmonella*

A Tabela 2 apresenta os resultados das análises microbiológicas no ceco de aves desafiadas ao 2º, 4º, 7º, 14º, 21º e 28º dia pós-desafio. Aos 7 dpd aves desafiadas com SE apresentaram redução significativa na contagem de *Salmonella* no ceco quando comparada as aves desafiadas com SM e SH. Não foram observadas diferenças significativas entre sorovares aos 2, 4, 14, 21 e 28 dpd.

Quando comparamos os resultados da microbiologia no ceco nos diferentes dias pós-desafio observa-se que aves desafiadas com SE apresentaram contagem significativamente maior aos 4 dpd e contagem significativamente menor aos 7 dpd quando comparado ao 14º e 28º dpd.

Aves desafiadas com SM e SH apresentaram contagem de *Salmonella* estatisticamente similar em todos os períodos avaliados com exceção dos 28 dpd quando foi observado redução no isolamento de *Salmonella* no ceco em relação aos demais dias avaliados.

Tabela 2 – Contagem de *Salmonella* Enteritidis, Minnesota e Heidelberg aos 2, 4, 7, 14, 21 e 28 dias pós-desafio no ceco de aves desafiadas (Resultados transformados em Log10 UFC/g)

Dias pós desafio	<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. Minnesota</i>	<i>S. Heidelberg</i>	Valor de P
2	4,54 ± 1,37 B	4,05 ± 0,37 A	4,23± 1,22 AB	0,6864
4	6,18±0,51 A	-	5,74±2,07 A	0,5486
7	1,59±1,23 C-b	4,73±1,06 A-a	4,42±2,15 A-a	0,0006
14	3,66±1,33 B	-	4,46±2,05 A	0,4069
21	4,33±1,90 B	3,93±1,51 A	4,66±1,40 A	0,2161
28	3,66±2,10 B	1,97±2,23 B	1,44±1,32 B	0,0992
Valor de P	0,0001	0,0007	0,0002	

a, b – Média e desvio padrão com diferentes letras na mesma linha apresentam diferença significativa para $P \leq 0,05$.

A, B – Média e desvio padrão com diferentes letras na mesma coluna apresentam diferença significativa para $P \leq 0,05$.

O efeito da data de desafio na eliminação de *Salmonella* também foi avaliado (Tabela 3). Foi possível observar diferença significativa em aves desafiadas com SE, SM e SH aos 21 dias pós-desafio. Aves desafiadas aos 14 dias de idade apresentaram maior eliminação de *Salmonella* para SE e SM quando comparada a aves desafiadas aos 7 dias de idade. Para aves desafiadas com *Salmonella* Heidelberg, o desafio aos 3 dias levou a excreção significativamente maior de *Salmonella* do que aves desafiadas aos 7 dias de idade na

avaliação de ceco aos 21 dpd. Estudos indicam que aves desafiadas com mais de três semanas de idade são menos susceptíveis a salmonela que aves desafiadas ao primeiro dia de idade e isto pode estar relacionado à maturidade do sistema imunológico da ave (Beal *et al.*, 2004, Marcq *et al.*, 2011).

Tabela 3 – Comparação da data de desafio na contagem de *Salmonella* Enteritidis, Minnesota e Heidelberg no ceco aos 21 dias pós-desafio (dpd). (Resultados transformados em Log10/UFC/g)

<i>Salmonella</i> Enteritidis			
	Desafio aos 7 dias	Desafio aos 14 dias	Valor de P
21 dpd	3,58±1,68 b	6,03±1,20 a	0,0010
<i>Salmonella</i> Heidelberg			
	Desafio aos 3 dias	Desafio aos 7 dias	Valor de P
21 dpd	5,35±1,17 a	4,10±0,52 b	0,0124
<i>Salmonella</i> Minnesota			
	Desafio aos 7 dias	Desafio aos 14 dias	Valor de P
21 dpd	2,90±1,30 b	4,75±1,15 a	0,0055

a, b – Média e desvio padrão com diferentes letras na mesma linha apresentam diferença significativa para $P \leq 0,05$.

A Tabela 4 apresenta os dados referentes a avaliação da dose desafio na contagem de *Salmonella*. Para SE aves desafiadas com 10^5 UFC/ave apresentaram maior contagem do que aves desafiadas com 10^6 UFC/ave na avaliação de ceco aos 21 dpd. Aves desafiadas com 10^8 UFC/ave apresentaram maior contagem que aves desafiadas com 10^6 UFC/ave na análise de ceco aos 28 dpd. Observa-se que para SE não há correlação entre dose desafio e contagem de *Salmonella*.

Para SH aves desafiadas com 10^7 UFC/ave apresentaram maior excreção de *Salmonella* do que aves desafiadas com 10^6 UFC/ave. Observa-se que no caso da SH, a maior dose desafio resultou na maior excreção de *Salmonella* aos 21 dpd no ceco.

Para SM, aves que foram desafiadas com a dosagem de 10^5 UFC/ave apresentaram maior contagem no ceco aos 21 dpd do que aves desafiadas com 10^6 UFC/ave. Dessa forma, observa-se que para SM a menor dose desafio resultou na maior contagem no ceco aos 21 dpd.

É possível observar que nem sempre uma dose alta reflete em altas quantidades excretadas de *Salmonella*, isso pode ser devido ao fato de a salmonela apresentar excreção intermitente como já observado em prévios estudos realizados em suínos (Ivanek *et al.*, 2012). Diferentemente, outros estudos indicam que aves desafiadas com *Salmonella* Typhimurium na concentração de 10^9 UFC/ave apresentaram maior excreção que aves desafiadas com 10^3 UFC/ave (Marcq *et al.*, 2011).

Tabela 4 – Comparação da dose de desafio na contagem de *Salmonella* Enteritidis, Minnesota e Heidelberg em diferentes dias pós-desafio (dpd) (Resultados transformados em Log₁₀ UFC/g)

<i>Salmonella</i> Enteritidis			
	10 ⁵ UFC/ave	10 ⁶ UFC/ave	Valor de P
21 dpd	4,90±1,48 a	3,04±2,19 b	0,0173
	10 ⁶ UFC/ave	10 ⁸ UFC/ave	
28 dpd	1,95±1,66 b	4,34±1,81 a	0,0035
<i>Salmonella</i> Heidelberg			
	10 ⁶ UFC/ave	10 ⁷ UFC/ave	
21 dpd	4,10±0,52 b	5,33±1,17 a	0,0124
<i>Salmonella</i> Minnesota			
	10 ⁵ UFC/ave	10 ⁶ UFC/ave	
21 dpd	4,75±1,14 a	2,90±1,30 b	0,0055

a, b – Média e desvio padrão com diferentes letras na mesma linha apresentam diferença significativa para $P \leq 0,05$.

Análise Histológica

A figura 1 apresenta vilosidades de íleo de aves não desafiadas (A) e vilosidades com alterações de aves desafiadas, sendo observado proliferação de células caliciformes, proliferação de enterócitos, congestão vascular, severa infiltração de células inflamatórias na lâmina própria (B, C e D).

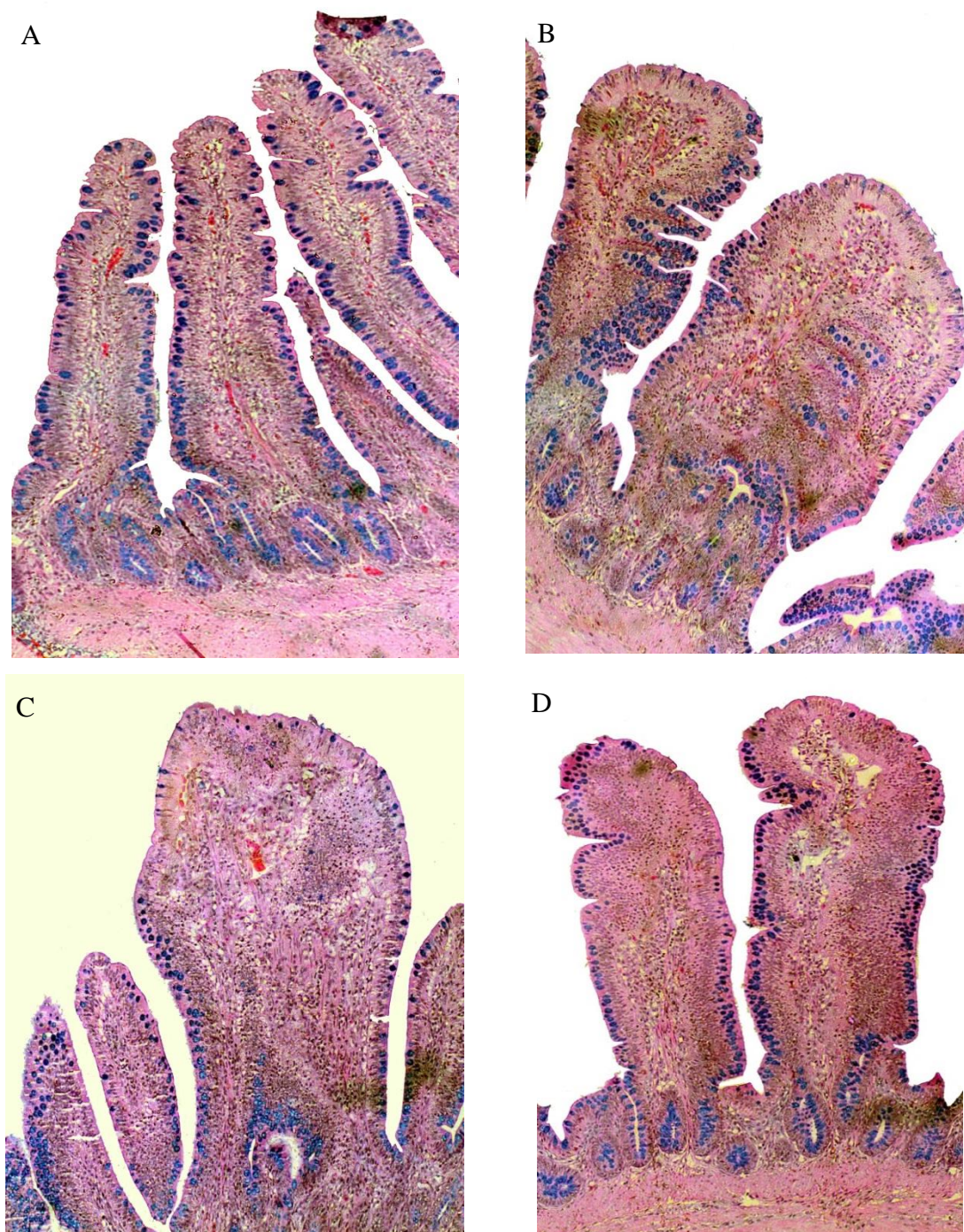


Figura 1 – A – Vilosidade sem alterações (aves não desafiadas). B – vilosidades com alterações: proliferação de células caliciformes, proliferação de enterócitos, congestão vascular (aves desafiadas); C – vilosidades com alterações: severa infiltração de células inflamatórias na lâmina própria, proliferação de células caliciformes e enterócitos (aves desafiadas); D – vilosidade com alterações: severa infiltração de células inflamatórias na lâmina própria e epitélio (aves desafiadas). Aves – íleo – HE/Alcian Blue – Magnificação de 100x.

A mucosa intestinal é o primeiro sítio de invasão da *Salmonella* no hospedeiro invadindo o epitélio intestinal, lâmina própria e sobrevivendo em macrófagos (Berndt *et al.*,

2007; Fields *et al.*, 1986). *Salmonella* Enteritidis foi observada 12 h após inoculação na lâmina própria do ceco de aves desafiadas ao 1º dia de vida, atingindo o pico aos 2 dias após inoculação (Van Immerseel *et al.*, 2002). A capacidade de invadir o epitélio e a lâmina própria cecal de frangos pode variar entre sorotipos de *Salmonella*. O sorovar Enteritidis, por exemplo, apresenta maior capacidade de invadir a lâmina própria, os sorovares Typhimurium e Hadar apresentam moderada capacidade invasiva e o sorovar Infantis baixa capacidade, sendo comumente encontrado nas células epiteliais, mas raramente encontrado na lâmina própria (Berndt *et al.*, 2007).

A Tabela 5 apresenta os resultados de escore de alteração para *Salmonella* no íleo de aves não desafiadas e desafiadas com SE, SM e SH em diferentes períodos pós-desafio. Para alteração histológica, na avaliação realizada entre dias pós-desafio, as aves não desafiadas apresentaram maior escore de alteração ao 1º e ao 21º dia pós-desafio, quando comparada aos demais dias. As principais alterações observadas foram infiltração de linfócitos na lâmina própria, aumento da espessura do epitélio e necrose apical.

Tabela 5 – Alteração histológica no íleo de aves não desafiadas e desafiadas com *Salmonella* Enteritidis, Minnesota e Heidelberg ao 1º, 2º, 4º, 18º, 21º e 28º dia pós-desafio (dpd)

Dias pós-desafio	Controle Negativo	S. Enteritidis	S. Minnesota	S. Heidelberg	Valor de P
1	27,50±9,43 AB	32,70±10,40 AB	23,00±14,60	-	0,1978
2	14,20±6,90 C	20,30±12,82 B	-	-	0,2018
4	14,60±8,43 C	-	-	23,30±14,76	0,1229
18	16,10±7,01 b-C	-	-	29,40±11,34 a	0,0055
21	32,30±9,16 A	36,60±14,32 A	36,20±20,80	-	0,7925
28	20,10±7,28 b-BC	29,60±10,03 a-AB	-	-	0,0262
Valor de P	0,0001	0,0298	0,1179	0,3138	

a, b – Média e desvio padrão com diferentes letras na mesma linha apresentam diferença significativa para $P \leq 0,05$.

A, B – Média e desvio padrão com diferentes letras na mesma coluna apresentam diferença significativa para $P \leq 0,05$.

O grupo desafiado com SE apresentou maior escore de alteração aos 21 dias pós-desafio, quando comparado aos 2 dias pós desafio, sendo necrose apical, infiltração de linfócitos na lâmina própria e proliferação de células calciformes as principais alterações

observadas. Para SM e SH não foram observadas diferenças estatísticas entre os dias pós-desafio.

Aves desafiadas com SE apresentaram alterações histológicas significativamente maiores aos 28 dpd em comparação ao grupo não desafiado. Aves desafiadas com SH apresentaram alterações significativamente maiores que aves não desafiadas aos 18 dpd. Para SM, não foram observadas diferenças entre as aves desafiadas e o grupo não desafiado em nenhum período avaliado, indicando que este sorovar ocasiona pouca ou nenhuma alteração na mucosa intestinal.

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos e os dias pós-desafio na avaliação de escore de alteração no ceco das aves (Tabela 6).

Tabela 6 – Escore de alteração no ceco de aves não desafiadas e desafiadas com *Salmonella* Enteritidis e Minnesota ao 1º, 2º, 21º e 28º dia pós-desafio (dpd)

Dias pós desafio	Controle negativo	S. Enteritidis	S.Minnesota	Valor de P
1	8,30±10,02	10,90±10,66	8,00±6,97	0,7503
2	8,70±2,16	13,60±7,67	-	0,0678
21	11,50±9,07	10,10±4,45	8,20±4,73	0,5246
28	9,80±8,95	10,30±3,23	-	0,8699
Valor de P	0,8206	0,6733	0,9410	

Poucos são os trabalhos que relatam as alterações histológicas ocasionadas pela SE, SH e SM no TGI de aves. A maioria dos trabalhos avalia a altura de vilosidades e profundidade de criptas em aves desafiadas, relatando maior altura de vilosidade e maior profundidade de criptas em aves desafiadas, correlacionando estes resultados com a renovação das células epiteliais durante a infecção e maior atividade proliferativa celular (Andrade *et al.*, 2012). No entanto, observa-se que avaliar somente altura de vilosidade e profundidade de criptas não é suficiente para quantificar as lesões ocasionadas pelos diferentes sorovares de *Salmonella*, sendo necessária avaliação de outras alterações como necrose apical, infiltração de linfócitos na lâmina própria e proliferação de células caliciformes e enterócitos, edema e congestão. No presente estudo, observou-se que SE e SH apresentaram alterações significativamente maiores em relação ao controle negativo. O sorovar SM foi o que apresentou menos alterações. No entanto, além do TGI outro órgãos podem ser afetados, como relatado por Nazir *et al.*, 2012, que observaram lesões no fígado,

baço, coração, pulmão, rim e bolsa cloacal em aves naturalmente infectadas por salmonelas móveis e imóveis.

Na avaliação de células caliciformes no íleo, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ao 1º, 2º, 4º, 18º, 21º e 28º dpd (Tabela 7). Porém, foi possível observar que houve significativa diminuição na contagem de células caliciformes aos 28 dpd quando comparado aos 4 dpd no grupo não desafiado (Tabela 7).

Tabela 7 - Contagem de células caliciformes por campo de aves não desafiadas ou desafiadas com *Salmonella* Enteritidis, Minnesota e Heidelberg ao 1º, 2º, 4º, 18º, 21º e 28º dia pós-desafio

Dias pós-desafio	Controle negativo	<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. Minnesota</i>	<i>S. Heidelberg</i>	Valor de P
1	36,30±21,32 AB	37,10±11,00	39,60±18,23	-	0,9070
2	32,10±14,16 AB	31,50±11,10	-	-	0,9172
4	49,40±14,73 A	-	-	52,00±21,47	0,7558
18	39,70±11,90 AB	-	-	51,8±21,94	0,1425
21	39,70±14,35 AB	44,60±18,96	33,80±13,91	-	0,3299
28	27,70±10,90 B	29,40±8,95	-	-	0,7074
Valor de P	0,0420	0,0599	0,4342	0,9838	

a, b – Média e desvio padrão com diferentes letras na mesma linha apresentam diferença significativa para $P \leq 0,05$.

Na avaliação de células caliciformes no ceco das aves, foi observado maior número de células caliciformes aos 2 e 21 dpd no grupo controle negativo quando comparado com aves desafiadas com SE (Tabela 8). Não foram observadas diferenças estatísticas nos demais parâmetros analisados. As células caliciformes tem importante papel na imunidade inata, pois são produtoras de mucina, a primeira molécula a ter contato com o patógeno, interagindo com a superfície celular da bactéria e impedindo a ligação na célula hospedeira (Kim e Khan, 2013). No caso de infecções por *Salmonella* a produção de mucina pelas células caliciformes é influenciada pelo receptor sinalizador IFN- γ que tem a finalidade de proteger o epitélio intestinal e também controlar a disseminação sistêmica do patógeno (Songhet *et al.*, 2011). A infecção por *Salmonella* Typhimurium em aves também causa aumento da densidade de células caliciformes na mucosa do jejuno, reduzindo a proporção de enterócitos e consequentemente prejudicando a absorção de nutrientes (Almeida *et al.*, 2014; Fasina *et al.*,

2010). No presente estudo, não foram observadas diferenças entre os sorovares na avaliação de células caliciformes no íleo e ceco.

Tabela 8 – Contagem de células caliciformes por campo no ceco de aves não desafiadas ou desafiadas com *Salmonella* Enteritidis e Minnesota ao 1º, 2º, 21º e 28º dia pós-desafio (dpd)

Dias pós-desafio	Controle negativo	S. Enteritidis	S.Minnesota	Valor de P
1	4,00±3,62	1,40±1,50	1,90±2,28	0,0803
2	4,60±3,27 a	0,80±0,79 b	-	0,0022
21	4,50±3,02 a	1,60±1,64 b	2,40±2,36	0,0338
28	1,40±1,42	1,60±1,43	-	0,7580
Valor de P	0,0678	0,5295	0,6364	

a, b – Média e desvio padrão com diferentes letras na mesma linha apresentam diferença significativa para $P \leq 0,05$.

Análise de Imunoistoquímica

A Tabela 9 apresenta os resultados da análise de células CD4+ no íleo de aves não desafiadas e desafiadas com *Salmonella* Enteritidis, Minnesota e Heidelberg.

Tabela 9 – Contagem de células CD4+ no íleo de aves não desafiadas e desafiadas com *Salmonella* Enteritidis, Minnesota e Heidelberg ao 1º, 2º, 4º, 14º, 18º e 28º dia pós-desafio

Dias pós-desafio	Controle negativo	S. Enteritidis	S. Minnesota	S. Heidelberg	Valor de P
1	14,52±9,34 a-A	11,40±5,00 ab-B	4,50±1,78 b-B	8,20±3,00 b-B	0,0008
2	6,33±2,79 b-C	10,80±4,14 a-B	-	-	0,0017
4	8,60±5,63 BC	-	-	5,85±5,13 BC	0,1148
14	14,67±4,98 a-AB	-	-	12,80±3,21b-A	0,4146
18	7,45±8,00 a-BC	-	-	3,25±3,82 b-C	0,0405
28	14,25±4,36 b-AB	18,75±8,00 a-A	13,20±4,05 b-A	-	0,0260
Valor de P	0,0004	0,0009	0,0001	0,0001	

a, b – Média e desvio padrão com diferentes letras na mesma linha apresentam diferença significativa para $P \leq 0,05$.

A, B – Média e desvio padrão com diferentes letras na mesma coluna apresentam diferença significativa para $P \leq 0,05$.

Ao primeiro dia pós-desafio aves não desafiadas apresentaram quantidade significativamente maior de células CD4+ no íleo quando comparado às aves desafiadas com SM e SH. Aos 2 dpd aves não desafiadas apresentaram redução nas células CD4+ quando comparadas as aves desafiadas com SE. Aos 14 e 18 dpd aves não desafiadas apresentaram quantidade significativamente maior de células CD4+ quando comparadas ao grupo desafiado com SH. Aos 28 dpd, aves não desafiadas e aves desafiadas com SM mostraram significativa redução nas células CD4+ no íleo quando comparada com aves desafiadas com SE.

Aves desafiadas com SE apresentaram aumento na quantidade de células CD4+ do 1º e 2º dpd ao 28º dpd. Aves desafiadas com SM apresentaram aumento de células CD4+ no íleo do 1º ao 28º dpd. Aves desafiadas com SH apresentaram aumento de células CD4+ no íleo do 1º ao 14º dpd e posterior redução ao 18º dpd.

A Tabela 10 apresenta os dados da avaliação de células CD4+ no ceco de aves não desafiadas ou desafiadas com *Salmonella* Enteritidis, Minnesota e Heidelberg. Ao 1º, 2º e 28º dpd aves desafiadas com SE apresentaram quantidade significativamente maior de células CD4+ no ceco quando comparadas as aves não desafiadas. Aves desafiadas com SM apresentaram contagem de CD4+ no ceco estatisticamente similar a aves não desafiadas ao 1º e 28º dpd. Aves desafiadas com SH apresentaram quantidade significativamente maior de células CD4+ ao 4º e 18º dpd quando comparadas a aves não desafiadas.

Tabela 10 – Contagem de células CD4+ no ceco de aves não desafiadas e desafiadas com *Salmonella* Enteritidis, Minnesota e Heidelberg ao 1º, 2º, 4º, 14º, 18º e 28º dia pós-desafio (dpd)

Dias pós-desafio	Controle negativo	S. Enteritidis	S.Minnesota	S. Heidelberg	Valor de P
1	7,70±2,21 b-BC	12,40±2,95 a-AB	9,90±2,68 ab-B	-	0,0019
2	5,00±2,17 b-C	10,00±3,02 a-B	-	-	0,0001
4	9,05±2,85 b-B	-	-	17,62±5,14 a	0,0001
18	12,05±3,60 b-A	-	-	20,05±4,10 a	0,0001
28	9,00±3,73 b-B	13,04±4,20 a-A	16,10±5,50 a-A	-	0,0001
Valor de P	0,0001	0,0456	0,0050	0,1032	

a, b – Média e desvio padrão com diferentes letras na mesma linha apresentam diferença significativa para $P \leq 0,05$.

A, B – Média e desvio padrão com diferentes letras na mesma coluna apresentam diferença significativa para $P \leq 0,05$.

A Tabela 11 apresenta a avaliação de células CD8+ no íleo de aves não desafiadas e desafiadas com *Salmonella* Enteritidis, Minnesota e Heidelberg. Aves desafiadas com SE apresentaram aumento de células CD8+ no íleo aos 28 dpd quando comparada ao 1º e 2º dpd. Aves desafiadas com SH apresentaram redução significativa de células CD8+ aos 18 dpd quando comparada aos dias 1, 4 e 14 dpd. O grupo não desafiado apresentou maior quantidade de células CD8+ ao 1º dpd quando comparado com as aves desafiadas com SE, SM e SH. Aves desafiadas com SH apresentaram quantidade significativamente menor de células CD8+ no íleo ao 18º dpd quando comparada as aves não desafiadas. Aos 28 dpd aves desafiadas com SM apresentaram quantidade significativamente menor de células CD8+ que aves não desafiadas ou desafiadas com SE.

Tabela 11 – Contagem de células CD8+ no íleo de aves não desafiadas e desafiadas com *Salmonella* Enteritidis, Minnesota e Heidelberg ao 1º, 2º, 4º, 14º, 18º e 28º dia pós-desafio (dpd)

Dias pós-desafio	Controle negativo	S. Enteritidis	S. Minnesota	S. Heidelberg	Valor de P
1	14,12±8,34 a-A	6,20±3,40 ab-B	6,90±2,20 b	7,87±2,23 b-B	0,0003
2	8,13±3,06 BC	8,93±4,29 B	-	-	0,5612
4	13,85±7,70 AB	-	-	10,55±6,24 AB	0,1448
14	10,27±3,84 AB	-	-	11,87±3,44 A	0,2398
18	6,65±5,52 a-C	-	-	0,30±0,47 b-C	0,0001
28	12,30±3,64 ab-AB	17,85±6,87 a-A	4,50±4,30 b	-	0,0001
Valor de P	0,0004	0,0001	0,1330	0,0001	

a, b – Média e desvio padrão com diferentes letras na mesma linha apresentam diferença significativa para $P \leq 0,05$.

A, B – Média e desvio padrão com diferentes letras na mesma coluna apresentam diferença significativa para $P \leq 0,05$.

A Tabela 12 apresenta a contagem de células CD8+ por campo no ceco de aves não desafiadas e desafiadas com *Salmonella* Enteritidis, Minnesota e Heidelberg.

Tabela 12 – Contagem de células CD8+ no ceco de aves não desafiadas e desafiadas com *Salmonella* Enteritidis, Minnesota e Heidelberg ao 1º, 2º, 4º, 14º, 18º e 28º dia pós-desafio (dpd)

Dias pós desafio	Controle negativo	S. Enteritidis	S. Minnesota	S. Heidelberg	Valor de P
1	13,90±4,07 a-BC	9,90±2,18 b-B	9,50±13,13 b	-	0,0086
2	6,27±2,19 b-D	8,40±2,38 a-B	-	-	0,0164
4	19,40±7,07 a-A	-	-	7,76±1,41 b-B	0,0001
18	14,20±4,85 b-B	-	-	21,25±4,47 a-A	0,0001
28	9,40±4,23 b-CD	19,00±8,15a-A	6,80±4,18 b	-	0,0001
Valor de P	0,0001	0,0001	0,1199	0,0001	

a, b – Média e desvio padrão com diferentes letras na mesma linha apresentam diferença significativa para $P \leq 0,05$.

A, B – Média e desvio padrão com diferentes letras na mesma coluna apresentam diferença significativa para $P \leq 0,05$.

Ao 1º dpd aves desafiadas com SE apresentaram menor quantidade de células CD8+ no ceco quando comparadas as aves não desafiadas. Porém, aos 2 e 28 dpd aves desafiadas com SE apresentaram quantidade significativamente maior de células CD8+ quando comparadas ao grupo não desafiado, indicando mobilização de células imunológicas para o sítio de ação no intuito de combater a infecção.

Aves desafiadas com SM apresentaram quantidade significativamente menor de células CD8+ no ceco quando comparada ao grupo não desafiado ao 1º e ao 28º dpd, o que sugere que SM induz menor resposta imunológica celular na mucosa intestinal dos animais comparando com SE. Muniz *et al.* (2015) estudando aves desafiadas com SM e SE demonstraram que SM não afeta o desempenho dos animais, enquanto SE reduz o ganho de peso diário das aves comparando com aves não desafiadas. É possível que essa menor mobilização de células imunológicas possa estar relacionada com menor demanda de recursos orgânicos no animal para defesa de infecções por SM.

Aves desafiadas com SH apresentaram menor quantidade de células CD8+ aos 4 dpd, porém com posterior aumento aos 28 dpd em comparação ao grupo não desafiado, indicando também que houve mobilização celular no ceco com a finalidade de combater a infecção por SH.

A Tabela 13 apresenta a avaliação de células CD4+ e CD8+ aos 28 dpd no íleo e ceco de aves desafiadas com SE fazendo uma comparação da data desafio aos 7 ou aos 14 dias de idade. Aves desafiadas com SE aos 7 dias de idade apresentaram quantidade significativamente maior de células CD4+ no íleo e de células CD8+ no íleo e no ceco quando comparadas ao grupo desafiado aos 14 dias de idade, indicando que quanto mais cedo o desafio por SE, maior a mobilização de células imunológicas no TGI.

Tabela 13 – Comparação entre datas de desafio na quantidade de células CD4+ e CD8+ no íleo e ceco de aves aos 28 dias pós-desafio (dpd) com *Salmonella* Enteritidis

Células	Desafio aos 7 dias	Desafio aos 14 dias	Valor de P
CD4+ 28 dpd ceco	13,80±3,82	11,90±4,70	0,2779
CD8+ 28 dpd ceco	23,20±7,56 a	12,70±3,83 b	0,0005
CD4+ 28 dpd íleo	23,70±8,35 a	13,80±3,26 b	0,0026
CD8+ 28 dpd íleo	22,40 ±6,20 a	13,30±3,92 b	0,0010

a, b – Média e desvio padrão com diferentes letras na mesma linha apresentam diferença significativa para $P \leq 0,05$.

A Tabela 14 apresenta a comparação entre doses desafio na contagem de células CD4+ e CD8+ no íleo e ceco de aves desafiadas com *Salmonella* Enteritidis. Aves desafiadas com 10^8 UFC/ave apresentaram quantidade significativamente maior de células CD4+ no íleo e de células CD8+ no íleo e no ceco quando comparadas com aves desafiadas com a dose de 10^5 UFC/ave de SE na avaliação realizada aos 28 dpd. Isto demonstra que quanto maior a dose administrada de SE, maior a mobilização de células imunológicas no íleo e ceco das aves.

Tabela 14 – Comparação entre dose desafio na contagem de células CD4+ e CD8+ no íleo e ceco de aves aos 28 dias pós-desafio (dpd) com *Salmonella* Enteritidis

<i>Salmonella</i> Enteritidis	10^5 UFC/ave	10^8 UFC/ave	Valor de P
CD4+ ceco 28 dpd	11,90±4,70	13,80±3,82	0,2779
CD8+ ceco 28 dpd	12,70±3,83 b	23,20±7,56 a	0,0005
CD4+ íleo 28 dpd	13,80±3,25 b	23,70±8,35 a	0,0026
CD8+ íleo 28 dpd	13,30±3,91 b	22,40±6,20 a	0,0010

a, b – Média e desvio padrão com diferentes letras na mesma linha apresentam diferença significativa para $P \leq 0,05$.

Salmonella é considerada um patógeno intracelular facultativo e a imunidade mediada por células tem papel importante na memória e eliminação do patógeno dos tecidos, com a participação de células T (Holt *et al.*, 2010). Van Immerseel *et al.* (2002) sugerem que no caso da resposta imunológica contra *Salmonella*, ocorre inicialmente uma resposta inflamatória não específica, responsável pela retirada da bactéria da lâmina própria e reduzindo assim a entrada na corrente sanguínea, sendo os macrófagos as principais células responsáveis por este processo. Após, a presença de células T irá conferir uma resposta imune específica. As células T CD4+ e T CD8+ desempenham importante papel no combate das infecções primárias por salmonelas, assim como a resposta por IgA e leucócitos polimorfonucleados (Berndt e Methner, 2001).

Sabe-se que a infecção por *Salmonella* ocasiona migração de células imunológicas do sangue para os órgãos alvo (Beirao *et al.*, 2012. Pickler. *et al.*, 2012). Prévios estudos observaram aumento de células CD4+, CD8+ e macrófagos no íleo e ceco de aves desafiadas com *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Senftenberg e *Salmonella* Mbandaka (Muniz *et al.*, 2015).

Estas alterações celulares também são acompanhadas por alterações na produção de citocinas, proteínas secretadas por células que tem importante papel na ativação e regulação celular durante resposta imunológica e processos inflamatórios (Wigley e Kaiser, 2003). Aumento de IFN- γ foi observado no fígado, íleo e tonsila cecal aos 3, 7 e 14 dias após inoculação com *S. Typhimurium* coincidindo com aumento de linfócitos T CD8+ e CD4+ no fígado (Withanage *et al.*, 2005). Da mesma forma, o aumento de IL-2 coincidiu com aumento de células CD4+ no ceco de frangos desafiados (Berndt *et al.*, 2007).

5.7 CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu avaliar a progressão da *Salmonella* no ceco de aves desafiadas com SE, SM e SH além de avaliar alterações histológicas e a dinâmica celular no íleo e ceco de aves desafiadas e não desafiadas. Na avaliação microbiológica, SE apresentou redução no isolamento no ceco ao 7º dpd, com posterior aumento ao 14º dpd mantendo-se estável até o fim do período avaliado ao 28º dpd. SM e SH mantiveram contagens constantes de 10^4 UFC/g do 1º ao 21º dpd, e aos 28 dpd apresentaram redução na contagem para 10 UFC/g.

Aves desafiadas com SE e SH apresentaram maiores alterações histológicas no íleo que aves não desafiadas, porém poucas alterações histológicas foram observadas em aves desafiadas com SM, indicando que este sorovar é menos agressivo à mucosa do TGI.

Na avaliação das células imunológicas foi possível observar que para todos os sorovares avaliados ocorre aumento inicial de células CD4+ tanto no íleo, como no ceco, indicando mobilização de células imunológicas para o combate à infecção. Na avaliação das células CD8+ no ceco observa-se que para SE, o aumento na contagem de *Salmonella* resulta no aumento de CD8+. No caso da SM, a redução na contagem bacteriana no ceco ocasionou redução nas células CD8+ ao final do período avaliado e no caso de SH mesmo com redução na contagem bacteriana a quantidade de células CD8+ permaneceu alta ao final do período avaliado, indicando que o desafio com SE, SM e SH ocasiona alterações distintas na dinâmica celular no TGI.

Também é possível concluir que para a *Salmonella* Enteritidis quanto mais cedo ocorre o desafio e quanto maior a dose utilizada, maior a mobilização de células CD4+ e CD8+ na mucosa intestinal, porém outros estudos devem ser conduzidos para avaliar se esta correlação também pode ser aplicada para os sorovares Minnesota e Heidelberg.

Com o intuito de melhor compreender a resposta imunológica de aves frente ao desafio com salmonelas paratíficas, fica claro que novos estudos *in vivo* devem ser conduzidos no sentido de correlacionar a presença de células imunológicas com a produção de citocinas e o efeito destas respostas no desempenho dos animais. Estes estudos poderão contribuir na busca de melhores formas de controle destas infecções.

5.8 REFERÊNCIAS

Andrade, C.Y.T.D.; Andrade, M.A.; Café, M.B.; Stringhini, J.H.; Mori, A.; Moraes, D.M.C.; Alcântara, J.B. Costa, H.X. Efeitos da *Salmonella* Enteritidis experimentalmente inoculada na saúde gastrointestinal de perus. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. p. 618-623, 2012.

Beal, R.K.; Wigley, P.; Powers, C.; Hulme, S.D.; Barrow, P.A.; Smith, A.L. Age at primary infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the chicken influences persistence of infection and subsequent immunity to re-challenge. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 100, n. 3–4, p. 151-164. 2004.

Beirao, B.C.; Favaro, C., Jr.; Nakao, L.S.; Caron, L.F.; Zanata, S.M.; Mercadante, A.F. Flow cytometric immune profiling of specific-pathogen-free chickens before and after

infectious challenges. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.145, n. 1-2, p. 32-41, 2012.

Berndt, A.; Methner, U. Gamma/delta T cell response of chickens after oral administration of attenuated and non-attenuated *Salmonella* Typhimurium strains. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.78, n. 2, p. 143-161, 2001.

Berndt, A.; Wilhelm, A.; Jugert, C.; Pieper, J.; Sachse, K.; Methner, U. Chicken cecum immune response to *Salmonella enterica* serovars of different levels of invasiveness. **Infection and Immunity**, v.75, n. 12, p. 5993-6007, 2007.

Brasil - MAPA, Instrução Normativa nº 62 publicada em 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**, Brasília, 2003.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. Persons infected with the outbreak strains of *Salmonella* Enteritidis, Hadar, Indiana, Muenchen or Muenster, by state of residence, as of September 23, 2015. Available in <http://www.cdc.gov/salmonella/live-poultry-07-15/map.html>. Acesso em 10 de janeiro de 2016.

Conceição, R.D.C.D.S.D.; Hentges, A.; Moreira, Â.N.; Vasconcellos, F.A.; Ângelo, I.M.R.; Carvalhal, J.B.; Aleixo, J.A.G.; Timm, C.D. Isolamento de *Salmonella* de produtos de frango e perfil de suscetibilidade dos isolados a antimicrobianos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v.66, p. 31-34, 2007.

Fields, P.I.; Swanson, R.V.; Haidaris, C.G.; Heffron, F. Mutants of *Salmonella* Typhimurium that cannot survive within the macrophage are avirulent. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.83, n. 14, p. 5189-5193, 1986.

Holt, P.S.; Vaughn, L.E.; Gast, R.K. Flow cytometric characterization of Peyer's patch and cecum tonsil T lymphocytes in laying hens following challenge with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.133, n. 2-4, p. 276-281, 2010.

Ivanek, R.; Österberg, J.; Gautam, R.; Sternberg-Lewerin, S. *Salmonella* fecal shedding and immune responses are dose and serotype dependent in pigs. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. 34660, 2012.

Marcq, C.; Cox, E.; Szalo, I.M.; Théwis, A.; Beckers, Y. *Salmonella* Typhimurium oral challenge model in mature broilers: Bacteriological, immunological, and growth performance aspects. **Poultry Science**, v. 90, n. 1, p. 59-67, 2011.

Mesa, D.; Lourenço, M.; Westphal, P.; Kraieski, A.; Santin, E. Modelo de protocolo experimental para induzir, classificar e avaliar as enterites inespecíficas em frangos de corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, p. 929-936, 2014.

Muniz, E.C.; Pickler, L.; Lourenço, M.C.; Kraieski, A.L.; Mesa, D.; Westphal, P.; Santin, E. Avaliação da resposta imunológica da mucosa intestinal de frangos de corte desafiados com diferentes sorovares de *Salmonella*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.35, p. 241-248, 2015.

Nazir, S.; Kamil, S. A.; Darzi, M.M.; Mir, M.S.; Nazir, K., Amare, A. Pathology of spontaneously occurring salmonellosis in commercial broiler chickens of Kashmir Valley. **Journal of Worlds Poultry Research**, v.2, n.4, p. 63-69, 2012.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Poultry**, v.9, 1994.

Pickler, L.; Hayashi, R.M.; Lourenço, M.C.; Miglino, L.B.; Caron, L.F.; Beirão, B.C.B.; Silva, A.V.F.; Santin, E. Avaliação microbiológica, histológica e imunológica de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis e Minnesota e tratados com ácidos orgânicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, p. 27-36, 2012.

Setta, A.M.; Barrow, P.A.; Kaiser, P.; Jones, M.A. Early immune dynamics following infection with *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Infantis, Pullorum and Gallinarum: cytokine and chemokine gene expression profile and cellular changes of chicken cecum tonsils. **Comparative Immunology and Microbiology Infectious Disease**, v. 35, n. 5, p. 397-41, 2012.

Smirnov, A.; Sklan, D.; Uni, Z. Mucin dynamics in the chick small intestine are altered by starvation. **Journal of Nutrition**, v. 134, n. 4, p. 736-742, 2004.

Van Immerseel, F.; De Buck, J.; De Smet, I.; Mast, J.; Haesebrouck, F.; Ducatelle, R. Dynamics of immune cell infiltration in the caecal lamina propria of chickens after neonatal infection with a *Salmonella* Enteritidis strain. **Developmental & Comparative Immunology**, v.26, n. 4, p. 355-364, 2002.

Voss-Rech, D.; Vaz, C.S.L.; Alves, L.; Coldebella, A.; Leão, J.A.; Rodrigues, D.P.; Back, A. A temporal study of *Salmonella enterica* serotypes from broiler farms in Brazil. **Poultry Science**, v.94, n. 3, p. 433-441, 2015.

Wigley, P.; Kaiser, P. Avian cytokines in health and disease. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.5, p. 1-14, 2003.

Withanage, G.S.; Wigley, P.; Kaiser, P.; Mastroeni, P.; Brooks, H.; Powers, C.; Beal, R.; Barrow, P.; Maskell, D; Mcconnell, I. Cytokine and chemokine responses associated with clearance of a primary *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in the chicken and in protective immunity to rechallenge. **Infection and Immunity**, v.73, n. 8, p. 5173-5182, 2005.

**CAPÍTULO 6 - AVALIAÇÃO DA CONTRIBUIÇÃO DE GENES DE FUNÇÃO
DESCONHECIDA NA COLONIZAÇÃO DA *SALMONELLA* NO TRATO
GASTRINTESTINAL DE FRANGOS.**

Este artigo será submetido à revista Applied and Environmental Microbiology.

6 AVALIAÇÃO DA CONTRIBUIÇÃO DE GENES DE FUNÇÃO DESCONHECIDA NA COLONIZAÇÃO DA *SALMONELLA* NO TRATO GASTRINTESTINAL DE FRANGOS.

Assessing the contribution of genes of unknown function to Salmonella's colonization of the chicken gastrointestinal tract.

6.1 RESUMO

Aves são um reservatório de *Salmonella* e em frangos a infecção por esta bactéria é inaparente, excretando altos níveis do patógeno nas suas fezes sem apresentar sinais clínicos da doença. Progressos significativos estão sendo feitos para melhor entender a contribuição de genes na patogênese da *Salmonella* e algumas informações permanecem no entendimento da genética básica por trás da colonização de animais de criação como os frangos. Enquanto o genoma da *Salmonella* foi sequenciado e anotado, ainda há muitos genes com função biológica que somente pode ser inferida, não sabendo a sua real contribuição na colonização. No presente estudo, foi utilizado uma deleção marcada de diversos genes de *Salmonella* possivelmente envolvidos com transporte de açúcares (*gfrEF*, *mltA*, *stm3780*, *stm3601*), de composição desconhecida e um gene regulatório (*ydiP*) para criar mutantes e determinar a sua aptidão relativa em comparação com a cepa parenteral de *Salmonella* Typhimurium. Todas as cepas foram marcadas como o gene bioluminescente *lux* com o objetivo de acompanhar a sua disseminação, usando análises de bioimagem em aves desafiadas via oral com a mistura de cepa mutante-selvagem de *Salmonella*. A *Salmonella* colonizou papo e ceco durante a primeira e a segunda semana de infecção, como pode ser observado pela bioimagem. Pouca bioluminescência foi observada no fígado e baço das aves desafiadas. Vários mutantes ($\Delta ydiP$, $\Delta mltA$, $\Delta gfrEF$) apresentaram vantagem competitiva em comparação com a cepa selvagem no ceco. Mutações afetando *stm3780* e *stm3601*, transportadores putativos de açúcares, apresentaram competição reduzida quando comparado a cepa selvagem. O índice competitivo mascarou as tendências nas colonizações para a *Salmonella* $\Delta mltA$, que quando avaliada em separado exibiu marcado declínio no ceco a partir de 9 dias após infecção. A aplicação desta abordagem para outros sorovares é necessária para determinar o papel geral da colonização por *Salmonella* e para conduzir o desenvolvimento de uma nova vacina viva para *Salmonella* em frangos.

Palavras-chave: *Salmonella*, colonização, frangos, aptidão.

6.2 ABSTRACT

Poultry is a significant reservoir for *Salmonella* infection in humans. In chickens, *Salmonella* infection is inapparent; birds shed high levels of this pathogen in its feces without showing any sign of disease. Significant progress has been made towards understanding genes that contribute to *Salmonella* pathogenesis, significant gaps remain in understanding the genetic basis behind its colonization of many food animals including chickens. While the *Salmonella* genome has been sequenced and annotated, there are many genes whose biological function can only be inferred, let alone known how it contributes to colonization. In this study, we used targeted deletion of several *Salmonella* genes inferred to be involved in transport (*gfrEF*, *mltA*, *stm3780*, *stm3601*) of sugars, of unknown composition; and one regulatory gene (*ydiP*) to create mutants and determine their relative fitness to the parental *S. Typhimurium* strain. All strains were tagged with bioluminescent gene marker *lux* in order to follow their

dissemination, using Bioimaging, in chickens orally challenged with mutant: wild-type *Salmonella* mix. *Salmonella* colonized crop and ceca during the first two weeks of infection, as determined using bioimaging. Very little to no luminescence was observed in the liver and spleen of *Salmonella* infected birds. Several of the *Salmonella* mutants ($\Delta ydiP$, $\Delta mltA$, $\Delta gfrEF$) appeared to have a competitive advantage over the wild-type strain in the chicken cecum. Mutations affecting *stm3780* and *stm3601*, putative sugar transporters, impaired colonization compared to the wild-type strain. Competitive indices masked colonization trends for one *Salmonella* strain, *mltA*, which when plotted alone, exhibited marked decline in the cecum starting at day 9 of infection. Application of this approach to other *Salmonella* serovars is likely determine their general role in *Salmonella* colonization of poultry and lead towards the development of new live *Salmonella* vaccines for poultry.

Key Words: *Salmonella*, colonization, poultry, fitness

6.3 INTRODUÇÃO

Salmonella enterica é uma das principais causas de toxinfecções alimentares em seres humanos e a bactéria é também colonizadora de diversos animais de criação como bovinos, suínos e aves. Ovos e carne de frango contaminados são a maior fonte de infecções por *Salmonella* (Luber, 2009), pois a bactéria é colonizadora do trato gastrointestinal (TGI) de aves, especialmente papo e ceco, onde normalmente é encontrada. (Barrow *et al.*, 1988).

A patogênese da *Salmonella* envolve uma série complexa e coordenada de eventos. Primeiramente, a bactéria é ingerida pelo hospedeiro e deve sobreviver ao pH ácido do proventrículo e atingir posteriormente o TGI inferior onde deve penetrar na camada de muco e atingir o epitélio onde adere-se aos enterócitos por meio da Fímbria tipo 1. A bactéria então invade as células epiteliais usando o sistema de secreção tipo III (SSTT), induzindo a fagocitose pela célula epitelial. A *Salmonella* fica contida em um vacúolo e é translocada para lado basolateral do enterócitos infectado. A *Salmonella* também é capaz de translocar-se para tecidos profundos via células M, onde encontra os macrófagos e as células apresentadoras de antígenos, que são células envolvidas com a imunidade de mucosa. Uma vez fagocitadas, a *Salmonella* afeta a maturação do fagossomo por meio de um segundo sistema de secreção tipo III, que permite que ela sobreviva e replique no compartimento intracelular. A *Salmonella* altera o lipopolissacarídeo (LPS), tornando-o resistente a proteínas catiônicas que impedem o fagolisossomos de ligar-se com os lisossomos (Ibarra e Steele-Mortimer, 2009). A adaptação da bactéria ocorre pela expressão coordenada de vários genes em resposta a sinais específicos presentes no hospedeiro.

Existem alguns trabalhos sobre o mecanismo pelo qual a *Salmonella* coloniza o TGI de frangos. Muito pouco se sabe sobre a habilidade da *Salmonella* sobreviver e crescer no trato gastrointestinal (Barrow *et al.*, 1988).

Mutagêneses marcadas e tecnologia de expressão genética *in vivo* identificaram genes necessários para a colonização da *Salmonella*, sua persistência e disseminação no animal hospedeiro (Chaudhuri *et al.*, 2013; Morgan *et al.*, 2004). Muitos destes genes são bem caracterizados e documentados por sua contribuição na patogênese, fisiologia, metabolismo e virulência. No entanto, para muitos genes, a função é desconhecida, ou na melhor das hipóteses inferida em seus domínios compartilhados com outras enzimas bem caracterizadas. Por exemplo, existem diversos transportadores de *Salmonella* anotados no genoma da *Salmonella* Typhimurium LT2, onde o substrato é desconhecido (McClelland *et al.*, 2001). Os substratos para alguns desses transportadores foram identificados como D-glucosaminato (Miller *et al.*, 2013), glicose-lisina/frutose-lisina (Miller *et al.*, 2015) e frutose-asparagina (Ali

et al., 2014). O papel desses genes não caracterizados na fisiologia e virulência da *Salmonella* no animal hospedeiro é atualmente desconhecida. Uma das maneiras de determinar a função desses genes é através da realização de ensaios competitivos envolvendo diferentes mutantes marcados com genes de resistência e cepas parenterais. Este método tem ajudado na identificação da contribuição de diversos genes na colonização da *Salmonella* (Cheng *et al.*, 2015).

No presente estudo, buscou-se a determinação da contribuição dos genes *gfrEF* (glicose-lisina/frutose-lisina), *stm3780* (hipotética frutose-1,6-bifosfato aldolase e membro do operon PTS), *mtlA* (transportador específico de manitol), *stm3601* (fosfoaçúcar isomerase putativo) e o *ydiP* (regulador transcricional hipotético) na colonização da *Salmonella* em frangos em um experimento de competição *in vivo*.

6.4 MATERIAL E MÉTODOS

Construção dos mutantes deletados de *Salmonella Typhimurium*

Foi utilizado o sistema Lambda Red para inativar os genes e operons de interesse na *Salmonella Typhimurium* cepa SL1344. As deleções dos genes *gfrEF*, *ydiP*, *stm3601*, *stm3780* e *mtlA* foram construídas como previamente descrito (Datsenko e Wanner, 2000).

Mini-Tn5 *luxCDABE* foi introduzido nas salmonelas mutantes e parenterais por transdução utilizando o fago P22. Em adição, marcadores de resistência a rifampicina foram também transduzidos nos mutantes de *Salmonella* por meio do fago P22 HTint. Este marcador de resistência foi utilizado para diferenciar os mutantes das cepas parenterais, marcadas com resistência a ácido nalidíxico em um experimento de competição *in vivo*. Todas as deleções foram confirmadas por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR).

Análise de bioimagem

A *Salmonella* bioluminescente foi construída utilizando o operon *luxCDABE* proveniente do *Photobacterium luminescens* como previamente descrito (Lewis *et al.*, 2006). A *Salmonella* bioluminescente foi identificada no ceco, papo, fígado e baço por meio do Sistema Xenogen (Caliper Life Sciences).

Competição *in vivo*

Para avaliar o efeito das deleções foi realizado um ensaio de competição *in vivo* por meio da colonização do TGI dos frangos. Os seguintes grupos foram avaliados:

Grupo A – *S. Typhimurium* SL1344 *lux*, rifampicina resistente $\Delta gfrEF$ vs. *S. Typhimurium* SL1344 *lux*, ácido nalidíxico resistente (cepa parenteral);

Grupo B – *S. Typhimurium* SL1344 *lux*, rifampicina resistente $\Delta ydiP$ vs. *S. Typhimurium* SL1344 *lux*, ácido nalidíxico (cepa parenteral);

Grupo C – *S. Typhimurium* SL1344 *lux*, rifampicina resistente $\Delta stm3601$ vs. *S. Typhimurium* SL1344 *lux*, ácido nalidíxico (cepa parenteral);

Grupo D – *S. Typhimurium* SL1344 *lux*, rifampicina resistente $\Delta stm3780$ vs. *S. Typhimurium* SL1344 *lux*, ácido nalidíxico (cepa parenteral);

Grupo E – *S. Typhimurium* SL1344 *lux*, rifampicina resistente $\Delta mtlA$ vs. *S. Typhimurium* SL1344 *lux*, ácido nalidíxico (cepa parenteral).

Setenta e cinco aves SPF (specific pathogen free) de um dia de idade foram alojadas em isoladores com filtros HEPA, sendo 15 aves por isolador e receberam água e alimento à vontade durante os 21 dias do período experimental. Aos dois dias de idade, cada ave foi inoculada via oral com uma mistura de 1:1 de *Salmonella* mutante e *Salmonella* parenteral (10^6 UFC/0,1 ml).

Amostras de fezes foram coletadas nos dias 5, 9, 11, 16, 18 e 21 de idade. As amostras eram homogeneizadas em Solução Salina com Gelatina em diluições decimais (10^{-1} até 10^{-7}) e 10 μ L eram distribuídos em placas de XLT4 com os antibióticos apropriados (rifampicina ou ácido nalidíxico na concentração de 64 μ g/ml). Os mutantes e as cepas parenterais foram enumerados em placas de XLT4 contendo rifampicina (64 μ g/mL) e ácido nalidíxico (64 μ g/mL), respectivamente após incubação a 35° C por 24 h.

Aos 3, 7, 14 e 23 dias de idade, 3 aves por grupo foram eutanasiadas para coleta de fígado, baço, ceco e papo. Os órgãos foram submetidos a análise de bioimagem por meio do sistema Xenogen. Ceco e papo com sinais de bioluminescência foram pesados e colocados em nascos, contendo volume 1:1 de Solução Salina com Gelatina. Os órgãos foram homogeneizados em *stomacher* e diluições decimais foram realizadas, posteriormente 10 μ L das amostras foram pipetados e distribuídos em placas de XLT4 com o rifampicina ou ácido nalidíxico. As placas foram incubadas à 35° C por 24 h e submetidas a posterior contagem das colônias típicas de *Salmonella*.

As colônias típicas de *Salmonella* foram contadas nas placas de XLT4 e o cálculo da razão mutante/parenteral foi realizado para o cálculo do índice competitivo (IC). Se o IC apresentasse valores > 1 significava que a colonização do mutante foi superior a da cepa parenteral, se o IC fosse < 1 significava que a colonização do mutante foi inferior à cepa

parenteral e caso o IC fosse igual a 1 significava que mutante e cepa parenteral apresentaram desempenho similar na colonização do TGI da ave.

6.5 RESULTADOS

Para determinar a contribuição de genes na colonização cecal, aves receberam por via oral uma mistura do mutante deletado e sua cepa parenteral. Este método permite acessar diretamente a contribuição dos genes selecionados, minimizando a variação entre animais. Para determinar a disseminação das cepas de *Salmonella* foi utilizado um sistema de bioimagem (Figura 1). Foi observado maior sinal de bioluminescência aos 3 dias de idade no ceco e papo, com constante redução aos 7 e 14 dias de idade, sendo o sinal fraco ou indetectável no ceco de aves aos 14 dias de idade. No fígado e baço dos animais o sinal da *Salmonella* bioluminescente observado foi muito fraco em todos os dias avaliados. Baseado nestas observações, as atenções foram focadas para determinar os níveis de *Salmonella* mutante e parenteral nas amostras de fezes e no ceco das aves.

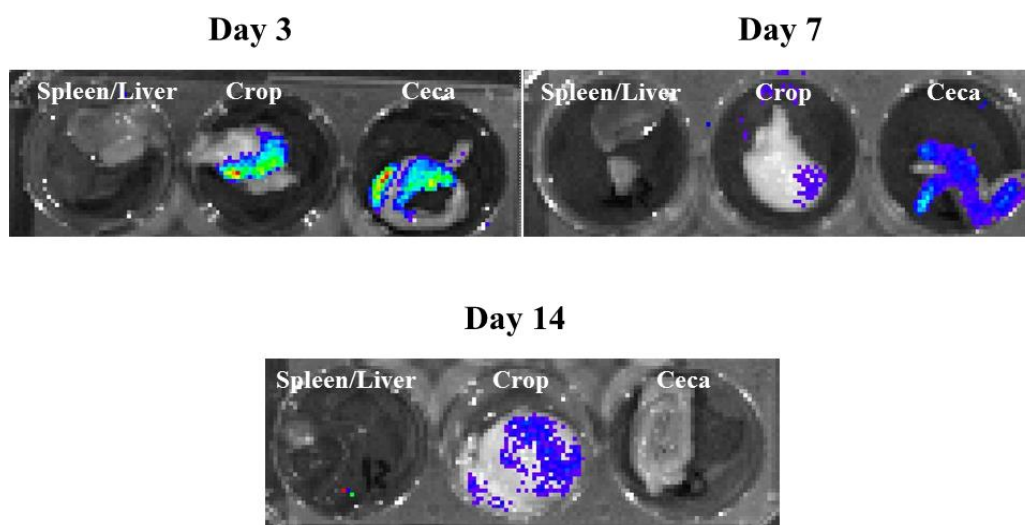


Figura – 1 Detecção da *Salmonella* Typhimurium bioluminescente aos 3, 7 e 14 dias de idade no baço, fígado, ceco e papo de frangos desafiados.

Na avaliação do índice competitivo foi observado que a colonização do mutante deletado *ydiP* foi de 1 a 2 Log10 superior ao da cepa parenteral aos 7, 9, 11, 14, 16 e 21 dias de idade (Figura 2A). Para o mutante *mtlA* a colonização foi de 1 a 2 Log10 superior a cepa parenteral aos 9, 11, 14, 16 e 21 dias de idade (Figura 2B). A colonização do mutante deletado *stm3780* foi superior em 1-Log10 frente a cepa parenteral aos 3 e 7 dias de idade. Porém, nos

dias 9, 11, 14 e 16 o mutante apresentou colonização de 1-Log10 inferior à cepa parental (Figura 2C). A mutação *stm3601* afetou a colonização somente aos 5 dias de idade (Figura 2D). Nos demais períodos avaliados, a mutação ou não apresentou nenhum efeito ou apresentou vantagem competitiva frente a cepa parental aos 14, 16 e 18 dias de idade. O mutante *gfrEF* foi 1-Log10 superior a cepa parental aos 7, 9, 14 e 16 dias de idade, indicando que o mutante apresentou vantagem competitiva frente a cepa parental (Figura 2E).

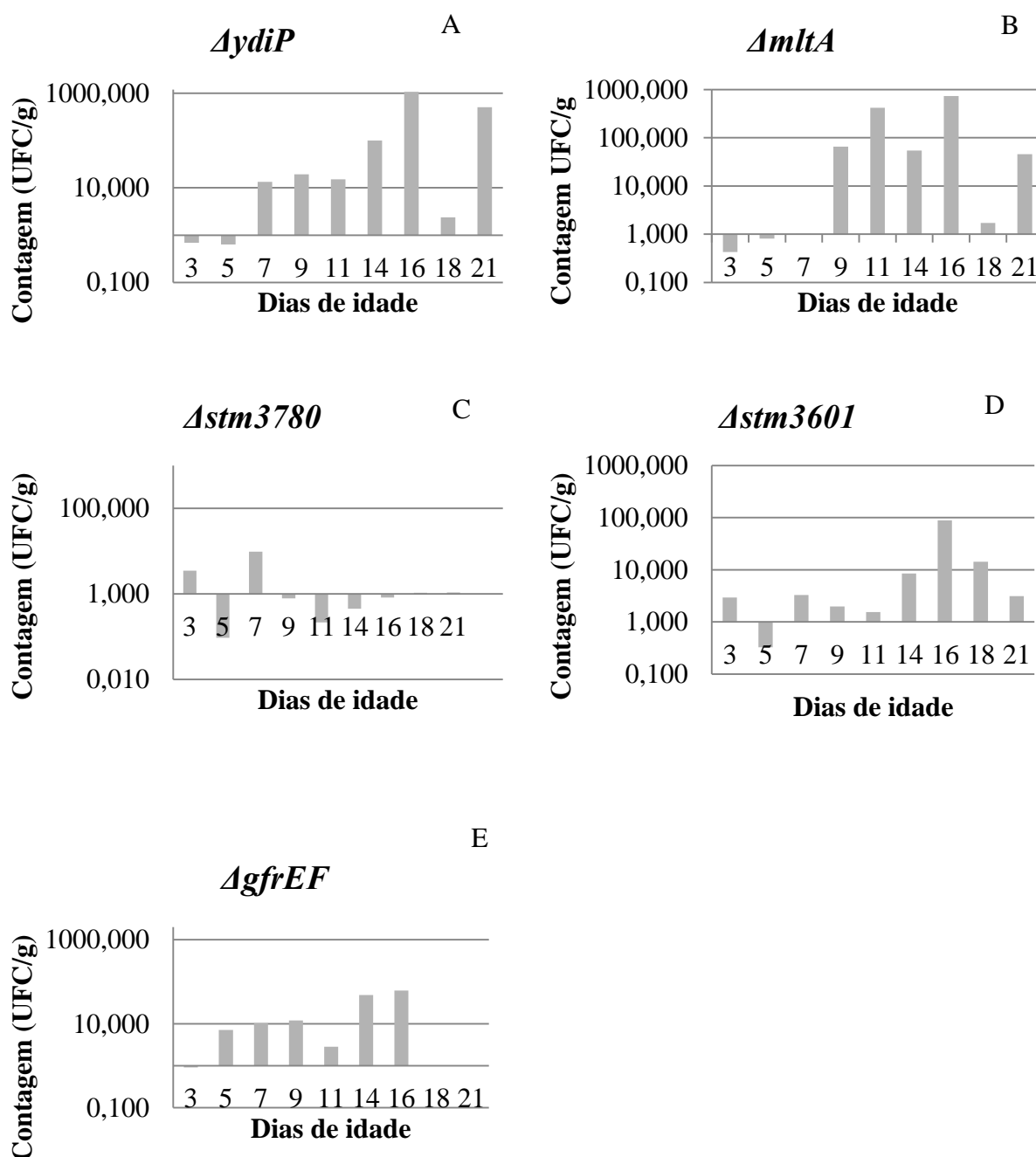


Figura – 2 Contribuição de genes da *Salmonella* Typhimurium de função desconhecida na colonização do TGI de aves. Índices Competitivos para mutantes de *Salmonella* Typhimurium: (A) $\Delta ydiP$; (B) $\Delta mltA$; (C) $\Delta stm3780$; (D) $\Delta stm3601$; e (E) $\Delta gfrEF$.

Para determinar se ocorreu alguma tendência na colonização cecal entre cepas mutantes ou parenterais que possa ter sido mascarada pelo índice competitivo, foi também realizada a avaliação individual de cada cepa (Figura 3). Para todas as cepas observou-se um declínio na contagem aos 5 dias de idade, especialmente para os mutantes *stm3780* e *stm3601*. Os mutantes *ydiP* e *mtlA* persistiram em altos níveis, cerca de 1 a 2 Log10 superiores a cepa parenteral nos períodos avaliados. O mutante *stm3780* apresentou colonização muito similar a cepa parenteral durante todo o período avaliado. Os mutantes *gfrEF* e *stm3601* apresentaram colonização inferior a cepa parenteral com constante decréscimo na contagem a partir dos 11 dias de idade até o final do período avaliado.

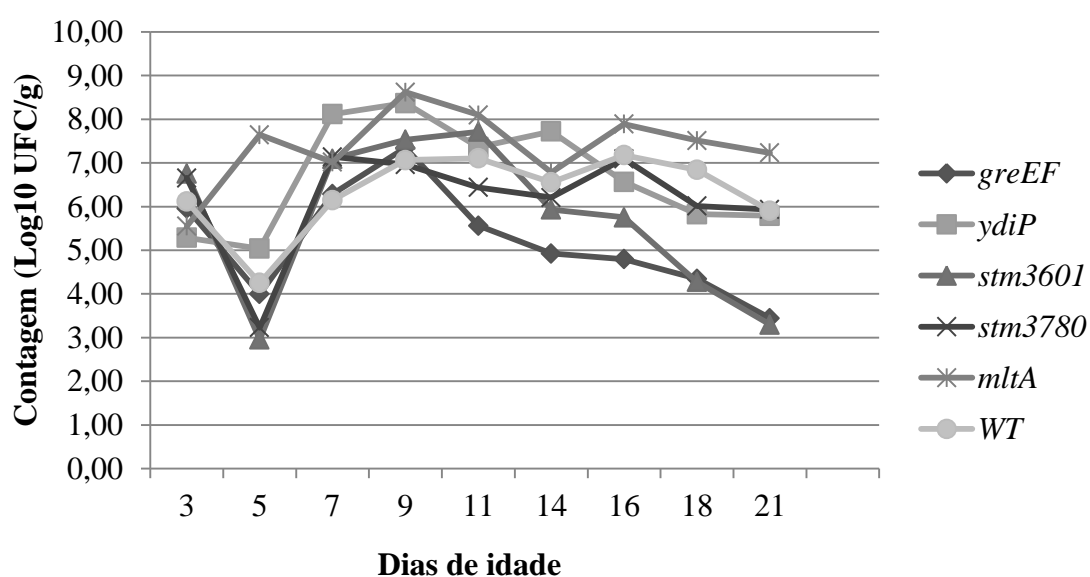


Figure 3 – Contagem de *Salmonella* (Log10 UFC/g) em aves desafiadas com *Salmonella* Typhimurium cepas mutantes e parenterais (WT).

6.6 DISCUSSÃO

No presente estudo, foi possível determinar a contribuição de genes de função desconhecida na colonização da *Salmonella* no TGI de aves. Como observado em prévios estudos, os principais sítios de colonização da *Salmonella* Typhimurium no TGI de aves é o papo e o ceco (Barrow *et al.*, 1988; Hargis *et al.*, 1995). No entanto, não foi possível isolar a *Salmonella* Typhimurium do fígado e baço como previamente relatado (Gast e Beard, 1990; Gast e Holt, 1998). A inability de detectar a *Salmonella* no fígado e baço pode ser atribuída a diferenças na cepa, sorovar e idade da inoculação. As aves são mais susceptíveis a sucumbir

frente a infecção fulminante com *Salmonella* ao primeiro dia de vida, sendo menos provável de apresentar sinais clínicos de doença com desafio aos 2 dias de idade ou mais.

A técnica de bioluminescência é uma ferramenta poderosa e não invasiva para monitoramento em tempo real da infecção em animais vivos (Foucault *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2014) e para detecção da *Salmonella* em produtos destinados a alimentação (Karsi *et al.*, 2008). No presente estudo o sistema Xenogen foi utilizado para identificar a infecção por *Salmonella* no papo, ceco, baço e fígado de aves. O sinal bioluminescente estava presente com maior intensidade aos 3 dias de idade com constante decréscimo até o final do experimento. O fígado e o baço não apresentaram sinal durante todo o período experimental. No presente estudo, não foi possível diferenciar a cepa mutante da cepa parenteral de *Salmonella*, pois as aves receberam inóculo com as duas cepas. Dessa forma, não é possível correlacionar o sinal bioluminescente com a contagem de *Salmonella* no ceco.

Para determinar a contribuição dos genes de função desconhecida na colonização do ceco, as aves receberam via oral uma mistura de 1:1 do mutante deletado e da cepa parenteral. O índice competitivo para *Salmonella* já foi previamente descrito (Cheng *et al.*, 2015; Harvey *et al.*, 2011). Este método permite o direto acesso à contribuição de genes selecionados minimizando a variação de animal para animal. Também permite avaliar se o mutante está utilizando os mesmo nutrientes nas mesmas condições que a cepa parenteral.

Baseado na contagem de *Salmonella* no ceco e nas amostras de fezes, observou-se que as mutações *ydiP* (regulador transcricional hipotético), *mtlA* (transportador específico de manitol) e *stm3780* (frutose-1,6-bifosfato aldolase) não afetaram na colonização da *Salmonella* quando comparado com cepa parenteral. O papel de genes de virulência e de metabolismo da *Salmonella* já foram relatados previamente. Cheng *et al.*, 2015 demonstraram a importância do curli e do transportador de Mgl na colonização da *Salmonella* Kentucky no TGI de aves.

Frente aos resultados do presente estudo, é possível observar que as mutações associadas com o metabolismo glicose-lisina/frutose-lisina (*gfrEF*) e fosfoaçúcar isomerase putativo (*stm3601*) afetaram a colonização da *Salmonella* no TGI das aves. Mutantes deficientes em LPS de *Salmonella* Typhimurium apresentaram redução na contagem no ceco quando comparados a cepa parenteral (Craven, 1994).

Autores reportaram que mutantes *hila*, *pipA* e *SEN0803*, relacionados com a Ilha de Patogenicidade 1; o mutante *SEN3503* relacionado com o metabolismo de carboidratos; o mutante *fljB*, relacionado com a motilidade e o mutante *SEN2278* codificador de proteínas hipotéticas, apresentaram atenuação *in vivo* na habilidade da *Salmonella* colonizar o intestino

delgado, ceco, fígado e baço (Addwebi *et al.*, 2014). Também foi observado que LPS, *dfsA*, *hupA* e pelo menos uma proteína responsável pela invasão são requeridas para colonização da *Salmonella* Typhimurium no TGI da ave (Turner *et al.*, 1998), demonstrando a importância do estudo dos genes de função desconhecida na colonização e sobrevivência da *Salmonella* no TGI.

6.7 CONCLUSÕES

No presente estudo, mutantes de *Salmonella* Typhimurium foram avaliados *in vivo* na sua capacidade de colonizar o TGI de aves. Genes associados como metabolismo da glicose-lisina/frutose-lisina e metabolismo fosfoaçúcar isomerase putativo afetaram a colonização da *Salmonella* no TGI de aves. Em contrapartida, mutações associadas com o metabolismo da frutose-1,6-bifosfato aldolase, com o transportador específico de manitol e com um regulador transcricional hipotético não afetaram a colonização. Alguns desses mutantes identificados neste estudo podem servir de candidatos para o desenvolvimento de vacinas vivas atenuadas para a prevenção de *Salmonella* Typhimurium em aves.

6.8 REFERÊNCIAS

Addwebi, T.M.; Call, D.R.; Shah, D.H. Contribution of *Salmonella* Enteritidis virulence factors to intestinal colonization and systemic dissemination in 1-day-old chickens. **Poultry Science**, v. 93, n. 4, p. 871-881, 2014.

Ali, M.M.; Newsom, D.L.; Gonzalez, J.F.; Sabag-Daigle, A.; Stahl, C.; Steidley, B.; Dubena, J.; Dyszel, J.L.; Smith, J.N.; Dieye, Y.; Arsenescu, R.; Boyaka, P.N.; Krakowka, S.; Romeo, T.; Behrman, E.J.; White, P.; Ahmer, B.M. Fructose-asparagine is a primary nutrient during growth of *Salmonella* in the inflamed intestine. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 6, p. e1004209, 2014.

Barrow, P.A.; Simpson, J.M.; Lovell, M.A. Intestinal colonisation in the chicken by food-poisoning *Salmonella* serotypes; microbial characteristics associated with faecal excretion. **Avian Pathology**, v. 17, n. 3, p. 571-588, 1988.

Chaudhuri, R.R.; Morgan, E.; Peters, S.E.; Pleasance, S.J.; Hudson, D.L.; Davies, H.M.; Wang, J.; Van Diemen, P.M.; Buckley, A.M.; Bowen, A.J.; Pullinger, G.D.; Turner, D.J.; Langridge, G.C.; Turner, A.K.; Parkhill, J.; Charles, I.G.; Maskell, D.J.; Stevens, M.P. Comprehensive assignment of roles for *Salmonella* Typhimurium genes in intestinal colonization of food-producing animals. **PLoS genetics**, v. 9, n. 4, p. 34-56, 2013.

Cheng, Y.; Pedroso, A.A.; Porwollik, S.; McClelland, M.; Lee, M.D.; Kwan, T.; Zamperini, K.; Soni, V.; Sellers, H.S.; Russell, S.M.; Maurer, J.J. rpoS-Regulated core genes involved in the competitive fitness of *Salmonella enterica* serovar Kentucky in the intestines of chickens. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 2, p. 502-514, 2015a.

Craven, S.E. Altered colonizing ability for the ceca of broiler chicks by lipopolysaccharide-deficient mutants of *Salmonella* Typhimurium. **Avian Diseases**, v. 38, n. 3, p. 401-408, 1994.

Datsenko, K.A.; Wanner, B.L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. **Proceedures of National Academy of Science USA**, v. 97, n. 12, p. 6640-6645, 2000.

Foucault, M.L.; Thomas, L.; Goussard, S.; Branchini, B.R.; Grillot-Courvalin, C. *In vivo* bioluminescence imaging for the study of intestinal colonization by *Escherichia coli* in mice. **Applied Environmental Microbiology**, v. 76, n. 1, p. 264-274, 2010.

Gast, R.K.; Beard, C.W. Isolation of *Salmonella* Enteritidis from internal organs of experimentally infected hens. **Avian Disease**, v. 34, n. 4, p. 991-993, 1990.

Gast, R.K.; Holt, P.S. Persistence of *Salmonella* Enteritidis from one day of age until maturity in experimentally infected layer chickens. **Poultry Science**, v. 77, n. 12, p. 1759-1762, 1998.

Hargis, B.M.; Caldwell, D.J.; Brewer, R.L.; Corrier, D.E. Deloach, J.R. Evaluation of the chicken crop as a source of *Salmonella* contamination for broiler carcasses. **Poultry Science**, v. 74, n. 9, p. 1548-1552, 1995.

Harvey, P.C.; Watson, M.; Hulme, S.; Jones, M.A.; Lovell, M.; Berchieri, A.; Young, J.; Bumstead, N.; Barrow, P. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colonizing the lumen of the chicken intestine grows slowly and upregulates a unique set of virulence and metabolism genes. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 10, p. 4105-4121, 2011.

Huang, Y.K.; Chu, C.; Wu, C.H.; Chen, C.L.; Chiu, C.H. Evaluation of Gram-negative bacterial infection by a stable and conjugative bioluminescence plasmid in a mouse model. **Journal of Biomedicine Science**, v. 21, n. 78, p. 014-0078, 2014.

Ibarra, J.A. Steele-Mortimer, O. *Salmonella* – the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival. **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 11, p. 1579-1586, 2009.

Karsi, A.; Howe, K.; Kirkpatrick, T.B.; Wills, R.; Bailey, R.H.; Lawrence, M.L. Development of bioluminescent *Salmonella* strains for use in food safety. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 10, p. 1471-2180, 2008.

Lewis, R.J.; Baldwin, A.; O'Neill, T.; Alloush, H.A.; Nelson, S.M.; Dowman, T.; Salisbury, V. Use of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 expressing lux genes to assess, in real time and *in situ*, heat inactivation and recovery on a range of contaminated food surfaces. **Journal of Food Engineering**, v. 76, n. 1, p. 41-48, 2006.

Lubber, P. Cross-contamination versus undercooking of poultry meat or eggs — which risks need to be managed first? **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, n. 1-2, p. 21-28, 2009.

Mcclelland, M.; Sanderson, K.E.; Spieth, J.; Clifton, S.W.; Latreille, P.; Courtney, L.; Porwollik, S.; Ali, J.; Dante, M.; Du, F.; Hou, S.; Layman, D.; Leonard, S.; Nguyen, C.; Scott, K.; Holmes, A.; Grewal, N.; Mulvaney, E.; Ryan, E.; Sun, H.; Florea, L.; Miller, W.; Stoneking, T.; Nhan, M.; Waterston, R.; Wilson, R.K. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. **Nature**, v. 413, n. 11677609, p. 852-856, 2001.

Miller, K.A.; Phillips, R.S.; Kilgore, P.B.; Smith, G.L.; Hoover, T.R. A Mannose family phosphotransferase system permease and associated enzymes are required for utilization of fructoselysine and glucoselysine in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Journal of bacteriology**, v. 197, n. 17, p. 2831-2839, 2015.

Miller, K.A.; Phillips, R.S.; Mrazek, J.; Hoover, T.R. *Salmonella* utilizes D-glucosamine via a mannose family phosphotransferase system permease and associated enzymes. **Journal of bacteriology**, v. 195, n. 18, p. 4057-4066, 2013.

Morgan, E.; Campbell, J.D.; Rowe, S.C.; Bispham, J.; Stevens, M.P.; Bowen, A.J.; Barrow, P.A.; Maskell, D.J.; Wallis, T.S. Identification of host-specific colonization factors of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Molecular microbiology**, v. 54, n. 4, p. 994-1010, 2004.

Turner, A.K.; Lovell, M.A.; Hulme, S.D.; Zhang-Barber, L.; Barrow, P.A. Identification of *Salmonella* Typhimurium genes required for colonization of the chicken alimentary tract and for virulence in newly hatched chicks. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 5, p. 2099-2106, 1998.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A busca contínua por alimentos seguros coloca a *Salmonella* como importante patógeno veiculado por alimentos e o seu controle é um desafio para as pessoas que trabalham com sanidade avícola. A *Salmonella* é um microrganismo de epidemiologia e patogenicidade complexa o que torna difícil seu controle e eliminação da cadeia avícola, especialmente pelo fato de existirem mais de 2500 sorotipos conhecidos.

Diante deste cenário surge a necessidade de buscar alternativas ao controle deste microrganismo e aditivos fitoterápicos, como por exemplo, o extrato de sanguinarina foi capaz de reduzir a proliferação da *Salmonella* no ceco de aves desafiadas além de proporcionar equilíbrio dos componentes da resposta imunológica celular do trato gastrointestinal de aves.

Ácidos orgânicos também são frequentemente utilizados pela indústria avícola com intuito de reduzir a contaminação por *Salmonella*. Porém, diante da grande quantidade de sorovares, se faz necessário um estudo mais aprofundado do efeito destes aditivos frente aos diferentes sorovares, pois observa-se que para *Salmonella* Minnesota, ácidos orgânicos na forma como são recomendados pelos fabricantes não são uma alternativa capaz de reduzir eficientemente a contaminação por este sorovar.

Ainda, no intuito de melhor compreender o papel dos principais sorotipos de *Salmonella* que acometem aves e dessa forma direcionar a melhor forma de controle é imprescindível avaliar a dinâmica celular do trato gastrointestinal, pois ela reflete diretamente na saúde da ave. Observa-se que a dinâmica celular no TGI, em especial a população de linfócitos T, é influenciada pelo sorotipo avaliado. *Salmonella* Minnesota, por exemplo, induz uma resposta imunológica menos acentuada que a *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Heidelberg e isto pode estar relacionado com a maior dificuldade no controle da *Salmonella* Minnesota.

A compreensão das bases genéticas e moleculares da *Salmonella*, em especial a função de alguns genes é ainda desconhecida. Dessa forma, estudos *in vivo* com salmonelas mutantes com genes deletados são importantes para compreensão da colonização, sobrevivência e captação de nutrientes no TGI da ave pela *Salmonella*. Alguns desses genes parecem não comprometer a sobrevivência do microrganismo no TGI, porém outros resultam em acentuada redução na colonização e são fortes candidatos para a produção de uma vacina viva.

A existência de inúmeros sorovares de *Salmonella* é um agravante no controle deste microrganismo, pois cada sorovar apresenta particularidades na colonização e resposta

imunológica. Para futuras pesquisas sugere-se ainda a avaliação de diferentes citocinas para compreensão da resposta imunológica em aves desafiadas com diferentes sorotipos de *Salmonella*, o que poderá auxiliar no desenvolvimento de novas ferramentas para controle deste complexo microrganismo.

8 ANEXOS

8.1 ANEXO 1

©2013 Poultry Science Association, Inc.

Effect of sanguinarine in drinking water on *Salmonella* control and the expression of immune cells in peripheral blood and intestinal mucosa of broilers

Larissa Pickler,* Breno C. B. Beirão,† Ricardo M. Hayashi,* Jean F. Durau,* Mariana C. Lourenço,* Luiz F. Caron,† and Elizabeth Santin*¹

*Microbiology and Ornithopathology Laboratory, Veterinary Medicine Department, Federal University of Paraná, Rua dos Funcionários 1540, Curitiba, PR 80035-050, Brazil; and †Federal University of Paraná, Department of Cytometry and Research and Development, Av. Coronel Francisco Santos, 100, Curitiba, PR, 81531-980, Brazil

Primary Audience: Veterinarians, Nutritionists

SUMMARY

The role of the gastrointestinal tract in the recognition and elimination of pathogenic microorganisms through inflammation is critical for the establishment of health. Sanguinarine is a quaternary ammonium salt that belongs to a group of benzophenanthridine and protopin alkaloids. The present study was conducted to evaluate the effects of using sanguinarine in the drinking water of broilers on reducing the *Salmonella* Enteritidis count and to assess changes in intestinal morphology and the expression of immune cells in the peripheral blood and intestinal mucosa of broilers challenged with *Salmonella* Enteritidis. The treatment of *Salmonella* Enteritidis-challenged broilers with sanguinarine via drinking water reduced *Salmonella* Enteritidis isolation in the cecum and in the crop at 7 d postinoculation when compared with the control group. Broilers treated with sanguinarine via drinking water presented a significantly lower expression of goblet and CD3⁺ cells in the duodenum and jejunum and higher expression of cells positive for the markers CD4, CD8 α , CD8 α^{bright} , CD8 α^{dim} , CD8 β , TCR V β 1, and CD28 in the blood compared with the nontreated birds. We also evaluated MHC I, MHC II and TCR $\alpha\beta$ V β 2, but no differences were observed between treatments.

Key words: sanguinarine, flow cytometry, immune system, protopin alkaloid, *Salmonella* Enteritidis

2013 J. Appl. Poult. Res. 22:430–438
<http://dx.doi.org/10.3382/japr.2012-00649>

DESCRIPTION OF PROBLEM

A healthy gastrointestinal tract (GIT) is essential for optimal animal production performance and overall health. The nutrients required by other body systems are digested and absorbed in the GIT. The GIT has an extensive

area exposed to pathogens such as *Salmonella*; therefore, it is predisposed to inflammation. The attempt to recognize and eliminate pathogenic microorganisms through inflammation is critical for the establishment of GIT health [1]. However, this inflammatory process may compromise proper animal development because

¹Corresponding author: santin@ufpr.br

8.2 ANEXO 2



Acta Scientiarum Veterinariae, 2014, 42: 1203.

RESEARCH ARTICLE
Pub. 1203

ISSN 1679-9216

Resposta imunológica e uso de ácidos orgânicos em frangos desafiados com *Salmonella* Minnesota

Immune Response and Use of Organic Acids in Broilers Challenged with *Salmonella* MinnesotaLarissa Pickler, Eduardo Correa Muniz, Leandro Nagae Kuritza,
Mariana Camargo Lourenço & Elizabeth Santin

ABSTRACT

Background: *Salmonella* control in poultry industry is of great importance to prevent foodborne diseases in humans. The intense control of *Salmonella* Enteritidis caused an increased isolation of other serotypes as *Salmonella* Minnesota (SM), and it cannot be affirmed that additives used to control *Salmonella* Enteritidis showed the same efficacy to control of other serovars. Therefore, the aim of this study was to evaluate the pathogenesis of SM in challenged broilers and the use of different organic acids for SM control in broilers.

Materials, Methods & Results: In the present study, three experiments were conducted. In the first experiment an in vivo study to evaluate the pathogenesis of the SM in broilers where the birds were divided into 4 treatments with 15 animals each: T1 - animals inoculated orally with SM, T2 - animals inoculated through feed with SM, T3 - "in-contact" birds caged with SM challenged birds and T4 - negative control. At 12, 24 and 48 h after the challenge, the crop, duodenum, cecum and liver were collected to detect SM. It was also collected fragments of jejunum, ileum and cecum for histopathological and immunohistochemistry analysis. At the microbiological evaluation 12 h after inoculation, it has already been possible to observe the presence of SM in the crop, duodenum and cecum of birds challenged orally and through feed. Twenty-four h after contact with the challenged birds, the in-contact group have already shown the presence of SM in crop and duodenum. It was observed a significant increase of goblet cells in the jejunum 24 h post inoculation (PI) in the orally inoculated birds, and in the ileum 48 h PI in the feed challenged birds. In immunohistochemical evaluation, 12 h PI the birds challenged orally have already shown a significant increase in the number of CD3+ cells in the jejunum and 24 h PI a significant increase of these cells in the ileum and cecum. In the second experiment an in vitro study was also performed to assess the minimum inhibitory concentration (MIC) of four organic acids against *Salmonella* Minnesota (SM). The MIC results were: organic acid A: 3.12%, organic acid B: 0.78%, organic acid C: 1.56%, organic acid D: 0.39%. In the third experiment it was evaluated the efficacy of different organic acids via water and food in chickens challenged with SM, where 30 broilers from 1st to 28th days of age were divided into six treatments with five animals each: T1 - negative control not challenged with SM, T2 - positive control challenged with SM, T3 - birds challenged with SM and treated with organic acid A in the feed, T4 - birds challenged with SM and treated with organic acid A in the feed and organic acid B in the water, T5 - birds challenged with SM and treated with organic acid C in the feed, T6 - birds challenged with SM and treated with organic acid C in the feed and organic acid D in the water. For microbiological evaluation cloacal swabs were collected 48 h PI and the crop and cecum were collected 7 days after inoculation. Only a significant reduction of SM in the crop of challenged birds was observed.

Discussion: Based on the results it was observed that SM has spread rapidly in the gastrointestinal tract of poultry and it could be isolated 12 h after oral inoculation. In histopathological analysis of intestinal segments it was possible to observe an initial increase of goblet cells and subsequent increase of lymphocytes T in challenged birds. In the experiments where the organic acids were used to control SM it was observed that the recommended dosage by the manufacturer is below that indicated by the MIC, which may have resulted in the low efficiency of the acids tested in the challenged animals.

Keywords: CD3+ cells, goblet cells, minimum inhibitory concentration, immunohistochemistry.

Descritores: células CD3+, células caliciformes, concentração inibitória mínima, imunohistoquímica.

Received: 29 March 2014

Accepted: 20 August 2014

Published: 6 September 2014

Universidade Federal do Paraná (UFPR), Departamento de Medicina Veterinária, Laboratório de Microbiologia e Ornitopatologia (LABMOR), Curitiba, PR, Brazil. CORRESPONDENCE: E. Santin [santin@ufpr.br - Fax: +55 (41) 3350-5859]. Universidade Federal do Paraná (UFPR), Departamento de Medicina Veterinária, Laboratório de Microbiologia e Ornitopatologia (LABMOR) Rua dos Funcionários n. 1540, Bairro Juvevê CEP80035-050 Curitiba, PR, Brazil.